

Charakterisierung von Mechanismen der Antigenprozessierung für die Präsentation auf MHC-Klasse-I

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München



Benjamin-Maximillian Fiebiger

2013

angefertigt am Helmholtz Zentrum München

Gutachter: 1. PD Dr. Josef Mautner
 2. Prof. Dr. Elisabeth Weiß

eingereicht: 12.03.2013

Datum der mündlichen Prüfung: 10.07.2013

Meinen Eltern dankbar gewidmet

I. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder versucht habe, eine Dissertation anderweitig einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen.

Die vorliegende Dissertation ist nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden.

München, März 2013

Benjamin-Maximillian Fiebiger

II. INHALTSVERZEICHNIS

I.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	4
II.	INHALTSVERZEICHNIS	5
III.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	10
IV.	TABELLENVERZEICHNIS	12
V.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	13
1.	ZUSAMMENFASSUNG	16
2.	EINLEITUNG	18
2.1	Das Immunsystem	18
2.1.1	Das angeborene und das erworbene Immunsystem	18
2.1.2	Das angeborene Immunsystem	18
2.1.3	Das adaptive oder erworbene Immunsystem	19
2.2	T-Lymphozyten	19
2.2.1	CD4 ⁺ T-Lymphozyten	20
2.2.2	CD8 ⁺ T-Lymphozyten	20
2.3	MHC-Moleküle	21
2.3.1	MHC-Klasse-I-Moleküle	21
2.3.2	MHC-Klasse-II-Moleküle	22
2.4	Die Antigenpräsentation	22
2.4.1	Die klassischen Antigenpräsentationswege	22
2.4.1.1	Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen	22
2.4.1.2	Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen	25
2.4.2	Die alternativen Antigenpräsentationswege	27
2.5	Proteinsynthese	27
2.5.1	mRNA-Translation	28
2.5.2	Die Pionier-Runde der Translation	28
2.5.3	Der mRNA-Qualitätskontroll-Mechanismus	29
2.6	Die Proteindegradation	29

2.6.1	Proteasomale Proteindegradation	29
2.6.2	Das Immunproteasom	31
2.6.3	Proteindegradation durch die Tripeptidyl-Aminopeptidase II (TPPII)	31
2.6.4	Ubiquitinylierung	32
2.6.5	Deubiquitinylierung	34
2.7	Defekte ribosomale Translationsprodukte - DRiPs	34
2.8	Fragestellung	36
3.	MATERIAL	37
3.1	Zelllinien	37
3.2	Plasmide	38
3.3	Bakterienstämme	40
3.4	Expressionsplasmide	40
3.5	Antikörper	41
3.5.1	Primärantikörper	41
3.5.2	Sekundärantikörper	41
3.6	Reagenzien	42
3.7	DNA-modifizierende Enzyme	42
3.8	Medien und Puffer	42
3.8.1	Zellkulturmedien	42
3.8.2	Allgemeine Puffer und Medien	43
3.9	Geräte	45
4.	METHODEN	46
4.1	Molekularbiologische Methoden	46
4.1.1	DNA-Klonierung	46
4.1.1.1	Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen	46
4.1.1.2	Synthese von glatten Enden nach dem Restriktionsverdau	47
4.1.1.3	Phenol-Chloroform-Extraktion	48
4.1.1.4	Extraktion der DNA-Fragmente aus einem Agarosegel	48
4.1.1.5	Ligation	49
4.1.1.6	Agarosegelelektrophorese	50
4.1.2	Amplifikation von Plasmid-DNA mit Hilfe von Bakterienkulturen	51
4.1.2.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien	51
4.1.2.2	Transformation elektrokompenter Bakterien mit Plasmid-DNA	51

4.1.2.3	Isolation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien	52
4.1.2.4	Isolation großer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien	53
4.1.2.5	Sequenzanalyse	54
4.1.3	Quantitative <i>RealTime</i> -PCR	55
4.1.3.1	RNA Isolation	55
4.1.3.2	Reverse Transkription von mRNA zur Synthese von cDNA	55
4.1.3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion	56
4.1.3.4	Quantitative <i>RealTime</i> -PCR	57
4.1.4	Herstellung von in vitro transkribierter RNA	59
4.2	Proteinbiochemische Methoden	60
4.2.1	Herstellung von RIPA-Extrakten	60
4.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	60
4.2.3	Western-Transfer	61
4.2.4	Immundetektion der transferierten Proteine	61
4.2.5	Quantifizierung der Proteinmenge	62
4.2.6	Coomassie-Färbung	63
4.2.7	Massenspektrometrie	63
4.3	Zellbiologische Methoden	64
4.3.1	Bestimmung der Zellzahl	64
4.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	65
4.3.3	Kultivierung humaner Zellen	65
4.3.4	Kultivierung von etablierten T-Zelllinien	66
4.3.5	Transfektion von adhärenenten Zellen mit Polyethylenimin	66
4.3.6	Transfektion von Suspensionszellen mittels Elektroporation	67
4.3.7	Auswaschen von Peptiden aus MHC-Klasse-I-Molekülen	67
4.3.8	Magnetische Zellseparation	68
4.3.9	Durchflusszytometrie	69
4.3.10	Enzyme-linked immunosorbant assay	69
4.3.11	Fluoreszenzmikroskopie	70
5.	Ergebnisse	71
5.1	Die Rolle maturer Proteine bei der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation	71
5.1.1	Expression von Modellantigenen mit modulierbarer Destabilisierungsdomäne	71
5.1.2	Modulation der Proteinstabilität mit Hilfe von Shield1	73
5.1.3	Verifizierung der mRNA-Stabilität der Fusionskonstrukte	75

5.1.4	Antigenspezifische T-Zellerkennung der Transfektanten in Abhängigkeit von Intensität und Dauer der rekombinanten Proteinexpression	76
5.1.5	Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression durch Strip-Behandlung	80
5.1.6	Mature Proteine tragen nicht zur MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation bei	82
5.1.7	Die Präsentation von EBNA1 auf MHC-Klasse-I ist abhängig von proteasomaler Prozessierung	84
5.2	Einfluss der Antigen-mRNA auf die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation	86
5.2.1	Die Stabilität der Antigen-mRNA hat keinen Einfluss auf die Effizienz der Antigengenerierung	86
5.2.2	Destabilisierende Elemente in der 3'untranslatierten Region der BZLF1-mRNA zeigen keinen Einfluss auf die Effizienz der Antigenpräsentation	91
5.2.3	Die Antigengenerierung setzt kein Spleißen der mRNA voraus	93
5.2.4	Die Bedeutung mRNA-assoziiierter Faktoren in der Antigengenerierung	94
5.2.5	Die Antigengenerierung erfolgt nach CAP-abhängiger und CAP-unabhängiger mRNA-Translation	96
5.3	Die Rolle der Ubiquitinylierung in der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation	98
5.3.1	Die Präsentation von BZLF1 und MART-1 auf MHC-Klasse-I erfolgt Proteasom-abhängig	98
5.3.2	Die Mutation ubiquitinylierbarer Aminosäuren in den Antigenen beeinträchtigt nicht die Präsentation auf MHC-Klasse-I	102
5.3.3	Für die Antigenpräsentation sind keine ubiquitinylierbaren Aminosäuren im Antigen notwendig	104
5.3.4	Massenspektrometrische Analysen lieferten keinen Hinweis auf eine N-terminale Ubiquitinylierung von BZLF1	106
5.3.5	Expression von BZLF1 im Endoplasmatischen Retikulum über eine Fusion mit der Signalsequenz von Apolipoprotein B	108
5.3.6	Die HRD1-vermittelte Ubiquitinylierung ist erforderlich für den Proteinabbau, nicht jedoch für die Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I	111
5.3.7	Eine Inhibition der Poly-Ubiquitinylierung durch Mutation von Lysin48 im Ubiquitin führt zu einer verminderten Antigenpräsentation	113

6.	Diskussion	116
6.1	Mature Proteine dienen nicht als Substrat für die Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I	116
	Die Modulation der Stabilität viraler Modellproteine	116
	Mature Proteine tragen nicht zur Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I bei	117
	Der <i>GA-repeat</i> verhindert nicht die Präsentation von EBNA1 auf MHC-Klasse-I	119
6.2	Einfluss der Antigen-kodierenden mRNA auf die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation	120
	Generierung von Antigen während der ersten Runde der mRNA-Translation	120
	Der Beitrag nukleärer Faktoren zur Antigengenerierung	121
6.3	Die Rolle der Ubiquitylierung in der MHC-Klasse-I-Antigen-prozessierung	125
	Effiziente Antigenpräsentation trotz Mutation ubiquitylierbarer Aminosäuren im Antigen	125
	Die Antigenpräsentation setzt keine Ubiquitylierung des Antigens voraus	125
	Die Ubiquitylierung ist notwendig für die Antigenpräsentation, erfolgt jedoch nicht am Antigen selbst	127
	Die Prozessierung von Antigen im ER erfolgt HRD1 unabhängig	129
7.	Ausblick	131
8.	Literaturverzeichnis	132

III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1:	Der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg	24
Abbildung 2.2:	Der MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg	26
Abbildung 2.3:	Das Ubiquitin-Proteasom-System	33
Abbildung 5.1:	Schematische Darstellung der Wirkungsweise des ProteoTuner Systems und der verwendeten Expressionskonstrukte	72
Abbildung 5.2:	Untersuchung der Proteinstabilität der Fusionsproteine	75
Abbildung 5.3:	Untersuchung der Stabilität der DD-Antigen-GFP mRNAs	76
Abbildung 5.4:	Spezifität und Sensitivität der verwendeten T-Zelllinien	77
Abbildung 5.5:	Die T-Zellerkennung der Transfektanten erfolgt Doxyzyklindosis- und zeitabhängig	79
Abbildung 5.6:	Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression und des Antigenpräsentationsniveaus durch Strip-Behandlung	81
Abbildung 5.7:	Ein verstärkter Abbau maturer Proteine resultiert nicht in einer vermehrten MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation an CD8 ⁺ T-Zellen	83
Abbildung 5.8:	Vergleich der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation von Wildtyp- EBNA1 und EBNA1ΔGA in Abhängigkeit von Proteinexpressionsniveau und Aktivität des Proteasoms	85
Abbildung 5.9:	Schematische Darstellung der mRNA des Modellantigens BZLF1	87
Abbildung 5.10:	Die Antigengenerierung erfolgt vermutlich während der ersten Runde der Translation	89
Abbildung 5.11:	Positive Korrelation der VQT-spezifischen T-Zellerkennung mit der DNA- Konzentration der beiden BZLF1 -Expressionsplasmide	90
Abbildung 5.12:	Das Anfügen einer destabilisierenden 3'UTR an die BZLF1-mRNA beeinträchtigt nicht die Präsentation von BZLF1 auf MHC-Klasse-I	92
Abbildung 5.13:	Die Antigengenerierung gespleißter und ungespleißter mRNA erfolgt mit vergleichbarer Effizienz	94
Abbildung 5.14:	Antigene, die nach Transfektion von in vitro transkribierter BZLF1-RNA translatiert werden, werden effizient an BZLF1-spezifische CD8 ⁺ T-Zellen präsentiert	95

Abbildung 5.15: Generierung von Antigen durch CAP-vermittelte und CAP-unabhängige Translationsinitiation	97
Abbildung 5.16: Proteasom-abhängige Stabilität der Fusionsproteine BZLF1-GFP- bzw. MART-1-GFP	99
Abbildung 5.17: BZLF1- und MART-1-YVL werden Proteasom-abhängig präsentiert	101
Abbildung 5.18: Die Mutation von potentiell ubiquitinylierbaren Aminosäuren beeinträchtigt nicht die Antigenpräsentation	103
Abbildung 5.19: Das Fehlen ubiquitinylierbarer Aminosäuren in BZLF1 und MART-1 beeinträchtigt nicht die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation	105
Abbildung 5.20: Massenspektrometrische Analyse von Wildtyp-BZLF1 und BZLF1-ΔCKST	108
Abbildung 5.21: Die ApoB-Signalsequenz vermittelte eine Lokalisation der BZLF1-Fusionsproteine im Endoplasmatischen Retikulum	110
Abbildung 5.22: Die Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I erfolgt unabhängig von einer HRD1-vermittelten Ubiquitinylierung der ER-Proteine	112
Abbildung 5.23: Die Ubiquitin-Mutante Ub-K48R inhibiert die MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation von BZLF1	115

IV. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1	HLA-Genotyp der verwendeten Zelllinien	37
Tabelle 3.2	Spezifität und Restriktion der verwendeten CD8 ⁺ T-Zellen	37
Tabelle 3.3	Erstellte Plasmide	38
Tabelle 3.4	Primärantikörper	41
Tabelle 3.5	Gekoppelte Sekundärantikörper	41
Tabelle 3.6	Zellkulturmedien	42
Tabelle 3.7	Allgemeine Puffer und Medien	43
Tabelle 4.1	Reaktionsansatz für den DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	47
Tabelle 4.2	Reaktionsansatz zur Synthese von glatten Enden mit T4 DNA-Polymerase	48
Tabelle 4.3	Reaktionsansatz der Ligation	49
Tabelle 4.4	Reaktionsansatz des Restriktionsverdaus	53
Tabelle 4.5	Ansatz der reversen Transkription	56
Tabelle 4.6	Standard-PCR-Ansatz	57
Tabelle 4.7	PCR-Ansatz für die quantitative RealTime-PCR	58
Tabelle 4.8	Reaktionsansatz für die Herstellung in vitro transkribierter RNA	59
Tabelle 4.9	Transfektions-Mix	66

V. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Anti/Alpha
A	Alanin
APC	<i>antigen presenting cell</i>
ApoB	ApolipoproteinB
β	Beta
bp	Basenpaare
C	Cystein
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celcius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CHX	Cycloheximid
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
CLIP	<i>class II invariant chain associated peptide</i>
CMV	Cytomegalievirus
CTL	<i>cytotoxic T cell</i>
Δ	Delta
D	Asparaginsäure
DD	Destabilisierungsdomäne
DMEM	<i>Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>2'-deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	2' Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
Dox	Doxzyklin
DRiPs	<i>defective ribosomal products</i>
dsRED	Rot fluoreszierendes Protein
EBNA	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF4	Eukaryotischer Initiationsfaktor 4
EJC	<i>exon junction complex</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
GAr	Glycin-Alanin repeat
γ	Gamma
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
Gy	Gray

h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HEK	<i>human embryonic kidney cell</i>
HEPES	(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl-Ethansulfonsäure
His ₆	6 x Histidin
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
H ₂ O	Wasser
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HS	Human-Serum
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
ivtRNA	In vitro transkribierte RNA
K	Lysin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCL	Lymphoblastoide B-Zelllinie
li	Invariante Kette
M	Mol(ar)
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MIIC	MHC-Klasse-II-Kompartiment
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
ml	Milliliter
min	Minute
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol(ar)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	Asparagin
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
nM	Nanomol(ar)
NMD	<i>nonsense mediated decay</i>
Ω	Ohm
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin

PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PTC	<i>premature termination codon</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Arginin
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
S	Serin
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
T	Threonin
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
Taq	Hitzestabile DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween 20</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
T _H	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TPPII	Tripeptidyl Aminopeptidase II
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
Ub	Ubiquitin
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
x g	X-fache Schwerkraft
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Thematik der vorliegenden Arbeit umfasste verschiedene, bislang noch ungeklärte Aspekte der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Frage untersucht, ob neben neu synthetisierten Proteinen, die bislang als Hauptantigenquelle gelten, auch mature Proteine in den MHC-I-Antigenpräsentationsweg einfließen. Dazu wurde mit Hilfe des ProteoTuner Systems die Stabilität von zwei Antigenen des Epstein-Barr-Virus moduliert. Die gezielte Destabilisierung und der dadurch ausgelöste proteasomale Abbau dieser Proteine führten jedoch nicht zu einer erhöhten MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation. Mature Proteine scheinen somit nicht in signifikantem Ausmaß in den Präsentationsweg für MHC-Klasse-I einzumünden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, in welchem Maße die Antigengenerierung durch die für das Antigen kodierende mRNA beeinflusst wird. In diesen Untersuchungen führte weder die Destabilisierung der Antigen-mRNA durch das Einfügen eines prämaternen Stopp-Codons und des dadurch vermutlich ausgelösten *nonsense mediated mRNA decay*, noch das Anfügen einer destabilisierenden 3' untranslatierten Region zu einer verminderten Antigenpräsentation. Darüber hinaus sprach die effiziente Präsentation von Antigen auf MHC-Klasse-I nach Expression gespleißter und ungespleißter Antigentranskripte sowie nach Transfektion in vitro transkribierter Antigen-RNA gegen eine essentielle Rolle von mRNA-assoziierten Faktoren in der Antigengenerierung. Dass die Antigenpräsentation nach Antigentranslation abhängig oder unabhängig von der Cap-Struktur mit ähnlicher Effizienz erfolgte, ließ darauf schließen, dass die Antigengenerierung auch nicht durch unterschiedliche Mechanismen der Translationsinitiation beeinflusst wird.

Da bekanntermaßen einerseits die Antigenprozessierung Proteasom-abhängig erfolgt, und andererseits Proteine für den proteasomalen Abbau durch Ubiquitin markiert werden, wurde abschließend die Rolle der Ubiquitinylierung in der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I untersucht. Dazu wurden von den Modellantigenen BZLF1 und MART-1 Mutanten erstellt, welche keine ubiquitinylierbaren Zielstrukturen mehr enthielten. Überraschenderweise hatte dies keinen Einfluss auf die Effizienz der Antigenpräsentation. Dagegen führte die Koexpression einer Ubiquitin-Mutante, welche eine Markierung der Proteine für den proteasomalen Abbau unterband, zu einem deutlichen Rückgang der Antigenpräsentation. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der proteasomale Abbau

von Proteinen zur Generierung von antigenen Peptiden Ubiquitin-abhängig erfolgt, die dafür essentielle Ubiquitinylierung jedoch nicht direkt am Substrat stattfindet.

2. EINLEITUNG

2.1 Das Immunsystem

2.1.1 Das angeborene und das erworbene Immunsystem

Das Immunsystem der Vertebraten besteht aus einer angeborenen und einer erworbenen oder adaptiven Komponente (Carroll und Prodeus, 1998). Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Spezifität gegen Pathogene. Das angeborene Immunsystem erkennt, bindet und eliminiert eine Vielzahl von Pathogenen unspezifisch und stellt durch das Mitwirken von Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen eine erste Barriere gegen Pathogene dar (Liaskou et al., 2012). Das adaptive Immunsystem hingegen umfasst T-Zellen und B-Zellen und bietet durch deren Mithilfe einen spezifischen Schutz gegen das jeweilige Pathogen und komplettiert das angeborene Immunsystem.

2.1.2 Das angeborene Immunsystem

Anatomische und physiologische Barrieren zählen zu der angeborenen Immunabwehr und stellen einen ersten Schutz gegen Pathogene dar. Dazu gehören aber auch spezialisierte, phagozytierende Zellen wie beispielsweise Makrophagen und Granulozyten, aber auch Entzündungsreaktionen sowie das Komplementsystem (Zhang et al., 2000).

Pathogene besitzen spezielle Oberflächenstrukturen, wodurch sie von körpereigenen Zellen unterschieden werden können. Diese Strukturen werden als PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern; PAMP*) bezeichnet (Kumar et al., 2009; Medzhitov, 2007). Sie sind unveränderliche Merkmale der Pathogene, die durch Keimbahn-kodierte PRRs (*pattern recognition receptor; PRR*), wie zum Beispiel die Toll-artigen-Rezeptoren (*Toll-like receptor; TLR*), des Wirts erkannt werden (Kawai und Akira, 2011). Dadurch können Abwehrreaktionen auch gegen Pathogene ausgelöst werden, mit denen der Organismus bislang keinen Kontakt hatte (Akira et al., 2006). Durch das angeborene Immunsystem können Infektionen verhindert, eliminiert oder bis zur Ausbildung einer antigenspezifischen Immunantwort

durch das adaptive Immunsystem eingedämmt werden (Akira et al., 2006; Albiger et al., 2007).

2.1.3 Das adaptive oder erworbene Immunsystem

Die adaptive Immunantwort beschreibt eine spezifische Abwehrreaktion, die entweder gegen ein bestimmtes Pathogen oder gegen eine als fremdartig identifizierte Zelle gerichtet ist. Beispiele hierfür sind Tumorzellen, welche nach Mutation aberrante Proteine exprimieren und somit Zell-fremde Antigene präsentieren. Ferner spielt das adaptive Immunsystem auch bei der Erkennung von körpereigenen Zellen eine große Rolle. Es kann zu einer überschießenden Immunreaktion gegen körpereigene Gewebe kommen, was dann als Autoimmunkrankheit bezeichnet wird. Die adaptive Immunantwort wird durch T-Lymphozyten, die eine Zell-vermittelte Immunität bewerkstelligen, und durch B-Lymphozyten, die spezifische Antikörper produzieren, vermittelt. Da T- und B-Lymphozyten die Fähigkeit haben, zu Gedächtniszellen auszudifferenzieren, kann nach erneutem Kontakt mit demselben Erreger eine schnelle und erregerspezifische Immunantwort erfolgen (Prlic et al., 2007). Voraussetzung für die Induktion einer zellvermittelten Immunreaktion ist die Aufnahme des Erregers oder dessen Bestandteile durch antigenpräsentierende Zellen, die Spaltung der Erregerproteine in Peptidfragmente, deren Bindung an Moleküle des sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex; MHC*) und die Präsentation der Komplexe auf der Zelloberfläche.

2.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten exprimieren sowohl einen T-Zell-Rezeptor als auch einen Korezeptor. Dabei handelt es sich entweder um einen CD4- oder einen CD8-Korezeptor. Die Art des Korezeptors bestimmt dabei, welches der beiden MHC-Moleküle, Klasse I oder Klasse II, gebunden werden kann. Die T-Lymphozyten werden anhand ihres Korezeptors in CD4⁺ oder CD8⁺ Subpopulationen unterteilt. CD4⁺ T-Zellen erkennen Antigen auf MHC-Klasse-II-Molekülen und CD8⁺ T-Zellen auf MHC-Klasse-I-Molekülen (Rudolph et al., 2006).

2.2.1 CD4⁺ T-Lymphozyten

Aufgrund ihrer supportiven Funktionen werden CD4⁺ T-Zellen auch als T-Helferzellen bezeichnet. So tragen sie sowohl zur zellulären als auch zur humoralen Immunabwehr bei. Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses. Da CD4⁺ T-Zellen eine Vielzahl von Aufgaben erfüllen und verschiedene Zytokine sezernieren, werden sie wiederum in weitere Untergruppen unterteilt. Die wichtigsten Gruppen werden als T_H1 und T_H2 bezeichnet. T_H1 Zellen tragen wesentlich zur Abwehr von Viren und intrazellulären Bakterien bei. Nach Aktivierung der T_H1 Zellen kommt es zur Sezernierung von Chemokinen und Zytokinen wie Interferon-gamma (IFN-γ), Tumornekrose-Faktor-α (TNF-α) und verschiedenen Interleukinen. Diese Botenstoffe wirken auf weitere Zellen des Immunsystems und steuern immunologische Reaktionen. Beispielsweise werden Makrophagen chemotaktisch durch sezernierte Chemokine zum Entzündungsherd gelockt oder T-Zellen durch Freisetzung von Interleukin-2 (IL-2) zur Proliferation angeregt (Murphy und Stockinger, 2010). T_H2 Zellen hingegen sind in erster Linie für die Aktivierung von B-Zellen verantwortlich. Durch die Bereitstellung zellständiger Liganden, wie z. B. CD40L, und die Ausschüttung bestimmter Zytokine, wie IL-4, IL-5 oder IL-13, regulieren sie die humorale Immunantwort (Del Prete, 1998; Grogan und Locksley, 2002). Darüber hinaus existieren noch weitere Subpopulationen an CD4⁺ T-Zellen. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}), die durch die Zelloberflächenmoleküle CD4 und CD25 sowie durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 charakterisiert sind, spielen eine wichtige Rolle bei der Begrenzung überschießender Immunantworten und der Vermeidung von Autoimmunreaktionen (Piccirillo et al., 2008; Sakaguchi et al., 2008). T_H17-Zellen sind sowohl verantwortlich für die Entstehung entzündlicher Prozesse, können aber auch zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen beitragen (Afzali et al., 2007; Awasthi und Kuchroo, 2009). Als Antwort auf Infektionen mit Bakterien und Pilzen, sezernieren T_H17-Zellen die Zytokine IL-21, IL-22 und natürlich IL-17, was zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führt (Bettelli et al., 2008; Miossec et al., 2009).

2.2.2 CD8⁺ T-Lymphozyten

Einen ebenso bedeutenden Beitrag zur zellulären Immunität des adaptiven Immunsystems leisten CD8⁺ T-Zellen. Wie zuvor erwähnt erkennen und binden CD8⁺ T-Zellen Peptid-

beladene MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen. $CD8^+$ T-Zellen sind vor allem an der Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen und virusinfizierten Zellen beteiligt. Nach Erkennung der Zielzelle sezernieren sie lytische Granula, die sowohl eine Perforation der Zielzellmembran als auch Apoptose in der Zielzelle auslösen (Dustin und Long, 2010; Keefe et al., 2005). Aufgrund der toxischen Wirkungsweise der $CD8^+$ T-Zellen werden diese auch als zytotoxische T-Lymphozyten (*cytotoxic T Lymphocytes*; CTL) bezeichnet.

2.3 MHC-Moleküle

Die MHC-Moleküle werden in MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle unterteilt (Zinkernagel und Doherty, 1979). Die zwei Klassen von MHC-Molekülen weisen strukturelle Unterschiede auf. Beide bestehen aus zwei Ketten, die von Genen kodiert werden, welche mit Ausnahme von β_2 -Mikroglobulin hoch polymorph sind, was eine extrem hohe Variabilität der MHC-Moleküle in der Bevölkerung erklärt. MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle unterscheiden sich in erster Linie durch ihre Struktur. Während MHC-Klasse-I aus zwei heterogenen Ketten besteht, setzt sich das MHC-Klasse-II-Molekül aus zwei homogenen Ketten zusammen, die beide in der Plasmamembran verankert sind. Während MHC-Klasse-I-Moleküle auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers vorkommen (Rammensee et al., 1993), werden MHC-Klasse-II-Moleküle nur auf wenigen Zelltypen, hauptsächlich des hämatopoetischen Systems, konstitutiv exprimiert.

2.3.1 MHC-Klasse-I-Moleküle

MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer schweren α -Kette und dem β_2 -Mikroglobulin. Die α -Kette setzt sich aus den drei Domänen α_1 , α_2 , und α_3 zusammen, wobei die α_3 -Domäne in der Plasmamembran verankert ist. Die Domänen α_1 und α_2 bilden zusammen die Antigenbindetasche aus, in der Peptide von acht bis zehn Aminosäuren gebunden werden können. Die β_2 -Mikroglobulin-Untereinheit ist nicht-kovalent mit der α -Kette verbunden und

nicht in der Plasmamembran verankert. Im weiteren Gegensatz zur α -Kette ist das für die β_2 -Mikroglobulinkette kodierende Gen nicht polymorph und liegt nicht im MHC-Locus (Townsend et al., 1989).

2.3.2 MHC-Klasse-II-Moleküle

Wie die MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen auch MHC-Klasse-II-Moleküle aus zwei Ketten. Diese werden ebenfalls als α - und β -Kette bezeichnet und sind über eine nicht-kovalente Bindung miteinander verbunden. Im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen sind beide Ketten in der Plasmamembran verankert. Zudem bilden beide Ketten zusammen den peptidbindenden Spalt aus, der im Gegenteil zu MHC-Klasse-I an beiden Enden offen ist und ein Binden von größeren Peptidfragmenten ermöglicht.

2.4 Die Antigenpräsentation

2.4.1 Die klassischen Antigenpräsentationswege

2.4.1.1 Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen

MHC-Klasse-I-Moleküle dienen der Präsentation von Peptiden intrazellulärer Herkunft. Sie stammen von zellulären oder auch viralen Proteinen ab, die durch einen Multiproteinkomplex, dem Proteasom, zu kurzen Peptidfragmenten abgebaut und durch zytoplasmatische Aminopeptidasen an ihrem N-terminalen Ende weiter prozessiert werden. Mit Hilfe des in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verankerten Transporters TAP (*transporter associated with antigen processing*; TAP) werden die Peptide ATP-abhängig ins ER befördert (Attaya et al., 1992; Heemels und Ploegh, 1995; Shastri et al., 2005). Die Synthese von MHC-Klasse-I-Molekülen erfolgt ins ER und wird durch verschiedene Chaperone unterstützt. Calnexin assistiert bei diesem Prozess und gewährleistet eine

korrekte Faltung. Anschließend lagert sich die β_2 -Mikroglobulinkette an die α -Kette an, was in der Bildung des MHC-I- $\alpha\beta_2$ -Komplexes resultiert. Dieser löst sich daraufhin vom membrangebundenen Calnexin ab. Daraufhin wird der Komplex von Calretikulin gebunden und zu TAP befördert. Durch Tapasin wird die Interaktion zwischen den MHC-Klasse-I-Molekülen und TAP erleichtert. Diese Interaktion sorgt für eine Beladung der MHC-Klasse-I-Moleküle mit den durch TAP eingeschleusten Peptiden (Rammensee et al., 1997; Leonhardt et al., 2005; Chapman und Williams 2009; Panter et al., 2012), die durch die ER-lokalisierte Aminopeptidase ERAAP (*Endoplasmatic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing; ERAAP*) weiter N-terminal getrimmt werden (Hammer et al., 2006; Lu et al., 2012; Nagarajan et al., 2012). Durch die Bindung eines Peptids werden die MHC-Klasse-I-Moleküle stabilisiert und erfahren eine Konformationsänderung. Dadurch löst sich der MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex vom TAP-Tapasin-Calretikulin-Komplex ab und wird durch vesikulären Transport über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche befördert (Pamer und Cresswell, 1998; Rock und Goldberg, 1999), wo eine Erkennung durch antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen erfolgen kann.

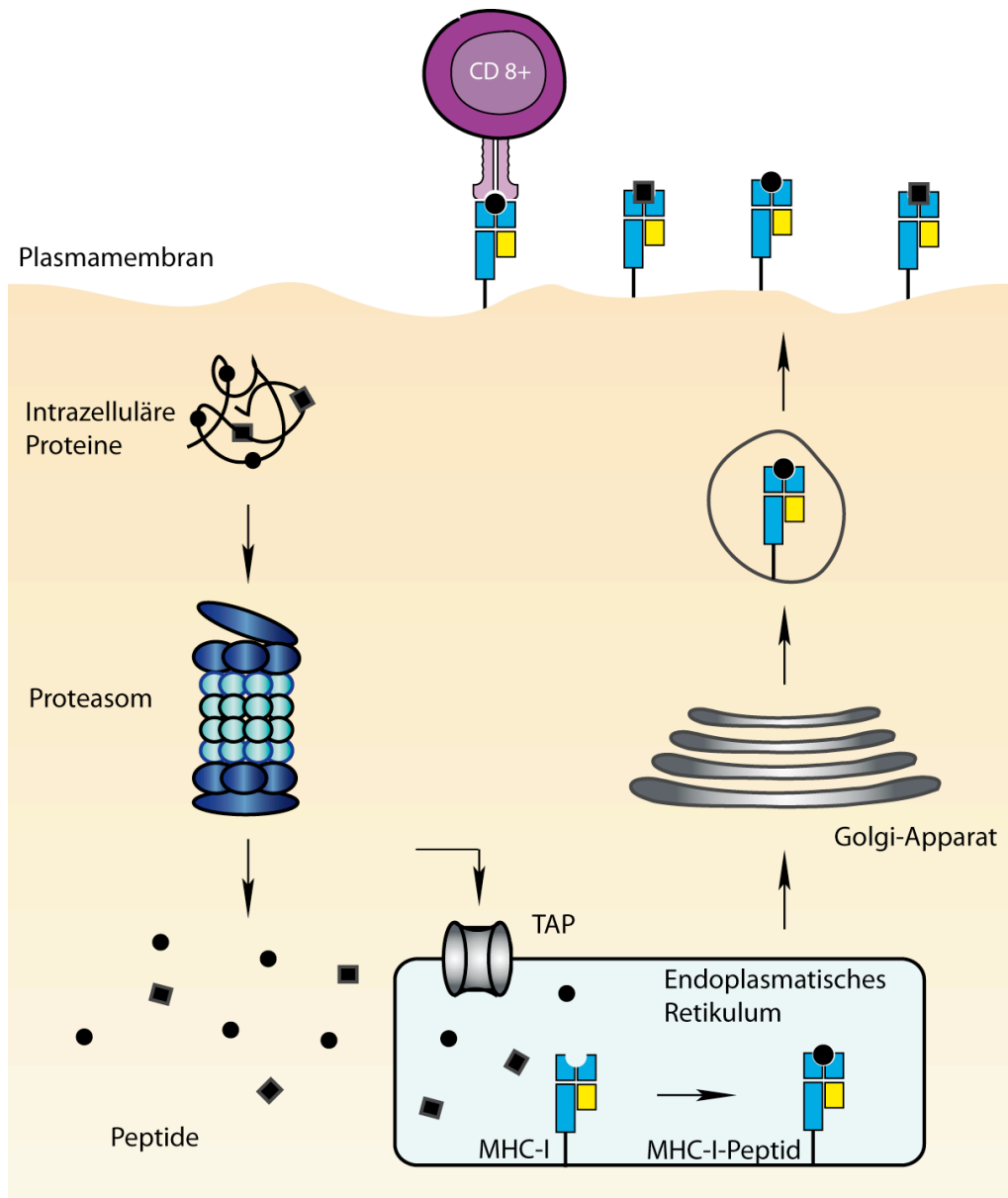


Abbildung 2.1: Der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg

Intrazelluläre Proteine werden durch das Proteasom in Peptide gespalten und durch den membranständigen Transporter TAP ins Endoplasmatische Retikulum befördert. Dort binden die Peptide von 8-10 Aminosäuren Länge an neu synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC-I). Mittels vesikulärem Transport gelangen die Peptid-beladenen MHC-Klasse-I-Moleküle über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran, wo sie von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden können.

2.4.1.2 Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen

MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren hauptsächlich Peptide, die von extrazellulären Proteinen abstammen. Diese gelangen über Endozytose in die Zelle und werden im endolysosomalen Kompartiment gespalten. Ähnlich wie im MHC-Klasse-I-Präsentationsweg werden auch MHC-Klasse-II-Moleküle kotranslational ins ER-Lumen synthetisiert. Dort kommt es zur Bildung eines Heterotrimers, bestehend aus der α - und β -Kette sowie aus der MHC-Klasse-II-assoziierten invarianten Kette Ii. Durch die invariante Kette wird die Peptidbindetasche blockiert, was eine vorzeitige Peptidbeladung im ER verhindert. Ferner vermittelt die invariante Kette den Transport des Komplexes aus dem ER über den Golgi-Apparat in das endosomale Kompartiment, wo es zur schrittweisen Degradation der invarianten Kette durch endosomale Proteasen kommt. Lediglich der als CLIP (*class II associated invariant chain peptide*; CLIP) bezeichnete Abschnitt der invarianten Kette in der Peptidbindetasche bleibt erhalten. Die Entfernung von CLIP erfolgt in einem als MIIC (*MHC II compartment*) bezeichneten Kompartiment mit Hilfe des nicht klassischen MHC-Klasse-II-Moleküls HLA-DM (*human leucocyte antigen-DM*) (Busch et al., 2000; Cresswell, 1996; Vogt und Kropshofer, 1999) und ermöglicht so die Bindung von Peptiden endozytierter Proteine (Sloan et al., 1995). Die beladenen MHC-Klasse-II-Moleküle werden daraufhin mit Hilfe von Vesikeln zur Plasmamembran transportiert, wo sie von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden können.

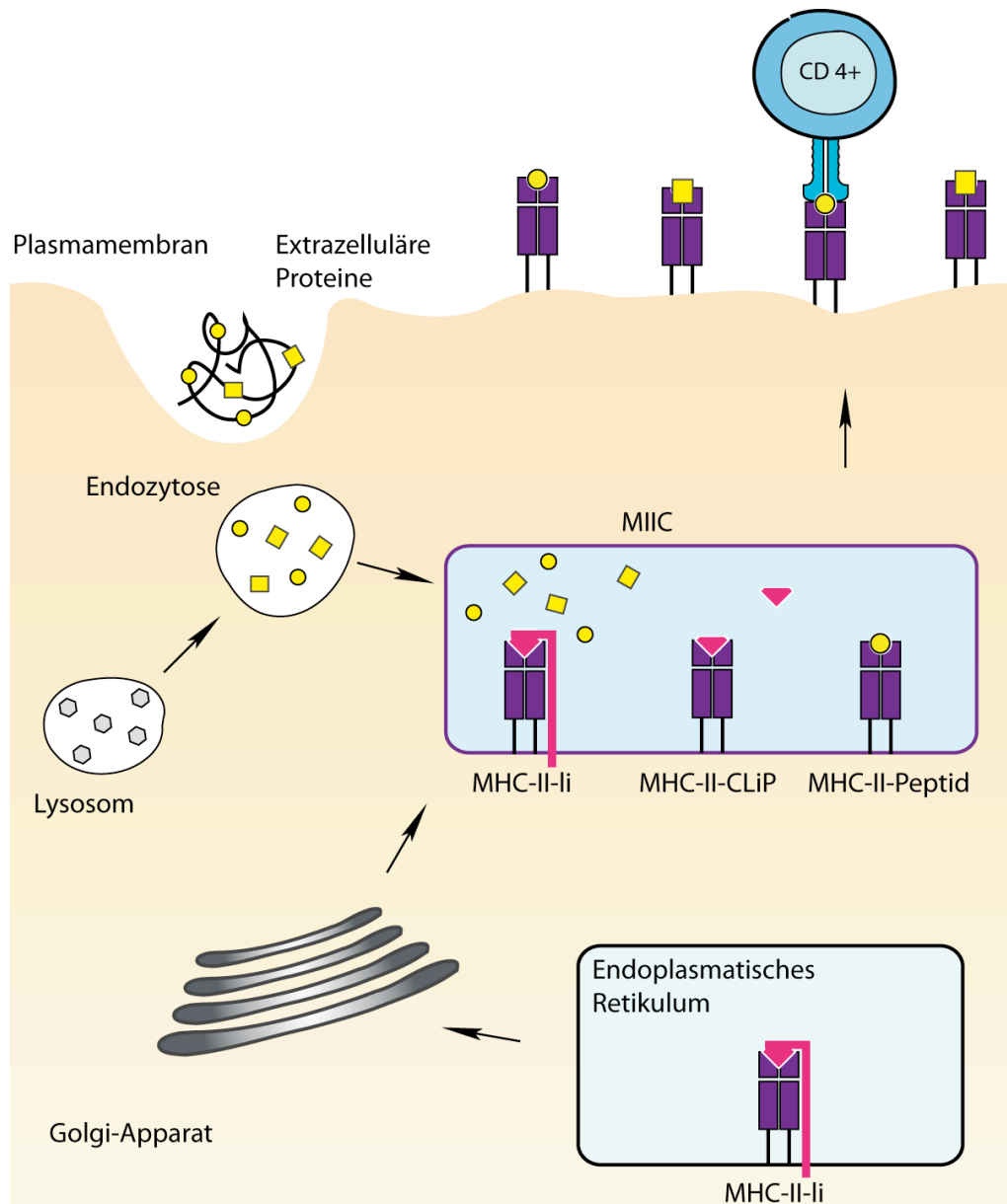


Abbildung 2.2: Der MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg

Die ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums synthetisierten MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC-II) assoziieren mit der invarianten Kette Ii, was eine frühzeitige Beladung mit Peptiden im ER verhindert. Anschließend gelangen die MHC-II-Ii Komplexe über den Golgi-Apparat ins MIIC (*MHC II compartment*), wo der schrittweise Abbau von Ii bis zu CLIP (*class II associated invariant chain peptide*) erfolgt. Extrazelluläre Proteine gelangen mittels Endozytose in Endosomen, wo es durch Ansäuerung oder durch Fusion mit Lysosomen zur Aktivierung von Proteasen und in der Folge zu einer Spaltung der aufgenommenen Proteine kommt. Nach Fusion der Endolysosomen mit MIIC kommt es zur Substitution von CLIP durch Peptide aufgenommener Proteine und anschließend zum Transport der Peptid-beladenen MHC-Klasse-II-Moleküle zur Zellmembran für die Erkennung durch CD4⁺ T-Zellen (Heath und Carbone, 2001).

2.4.2 Die alternativen Antigenpräsentationswege

Neben den klassischen Antigenpräsentationswegen wurden in den letzten Jahren auch alternative Präsentationswege beschrieben, deren Funktionsweise jedoch bislang noch nicht bis ins Detail aufgeklärt wurde.

Über diese alternativen Antigenpräsentationswege werden extrazelluläre Antigene auf MHC-Klasse-I und intrazelluläre Antigene auf MHC-Klasse-II geladen (Malnati et al., 1992; Mukherjee et al., 2001; Rock et al., 2010).

So konnte nachgewiesen werden, dass eine Subpopulation dendritischer Zellen Peptide exogener Proteine auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren kann (den Haan et al., 2000; Savina und Amigorena, 2007). Dieser auch als Kreuzpräsentation bezeichnete Präsentationsweg ist von entscheidender Bedeutung bei der Induktion von CD8⁺ T-Zellantworten gegen Tumoren oder auch Pathogene, die dendritische Zellen nicht infizieren (Heath et al., 2004).

Die Präsentation intrazellulärer Antigene auf MHC-Klasse-II scheint dagegen in allen bislang untersuchten MHC-Klasse-II-positiven Zellen stattzufinden und wird durch Autophagie vermittelt. Über Autophagie gelangen intrazelluläre Bestandteile ins vesikuläre Kompartiment, wo die Spaltung in Peptide und deren Beladung auf MHC-Klasse-II-Moleküle erfolgt (Nimmerjahn et al., 2003).

2.5 Proteinsynthese

Die Translation der Boten-RNA (*messenger-RNA*; mRNA) erfolgt an 80S-Ribosomen entweder im Zytoplasma oder, im Fall von sezernierten oder membranständigen Proteinen, an der Membran des ER (Malys und McCarthy, 2011).

2.5.1 mRNA-Translation

Unmittelbar nach oder bereits während der Transkription im Zellkern wird die prä-mRNA gespleißt und mit einer 7-Methyl-Guanosin-Kappe am 5'-Ende und einer Poly-A-Sequenz am 3'-Ende versehen. Danach wird die mature mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert. Zur Initiation der Translation wird die 5'-CAP-Struktur von verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren (eIFs) gebunden, die zusammen den Translationsinitiationskomplex bilden (Gingras et al., 1999; Sonenberg und Hinnebusch, 2009). Dieser ist die Basis für die Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit an die mRNA. Entsprechend ihrem Sedimentationskoeffizienten werden die kleine und große ribosomale Untereinheit als 40S und 60S bezeichnet. Nach Erkennung eines Start-Codons bindet auch die große 60S Untereinheit, wodurch die Translation der mRNA initiiert und das kodierte Protein synthetisiert wird (Jackson et al., 2010; Pain, 1996).

Im Gegensatz zur klassischen mRNA, welche nur einen distinkten Leserahmen besitzt und somit nur für ein Protein kodiert, können manche mRNAs, beispielsweise von Viren, auch für mehrere Proteine kodieren. In diesem Fall werden einzelne Leserahmen durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site; IRES*) voneinander getrennt. Diese IRES-Sequenzen ermöglichen eine CAP-unabhängige Translation von stromabwärts gelegenen offenen Leserahmen (Belsham und Sonenberg, 1996; Gilbert, 2010).

2.5.2 Die Pionier-Runde der Translation

Eine mRNA dient in der Regel mehrmals als Matrize für die Proteinsynthese. Die erste Runde der Translation (*pioneer round of translation*) wird definiert durch das erste Ribosom, welches die mRNA vollständig abläuft und translatiert. Eine neu-synthetisierte mRNA trägt bestimmte Markierungen, wie beispielsweise Proteine, die die Exon-Exon-Verbindungsstellen (*exon junction complex; EJC*) markieren (Le Hir et al., 2000a). Die Translation durch das erste Ribosom führt zur Entfernung dieser Proteine, wodurch die mRNA den Status einer neu-synthetisierten mRNA verliert (Le Hir et al., 2000b).

2.5.3 Der mRNA-Qualitätskontroll-Mechanismus

Durch Mutationen oder auch durch Fehler während der Transkription kann es zur Entstehung eines frühzeitigen Stop-Codons (*premature termination codon*; PTC) kommen, welches im kodierenden Bereich liegt. Um zu verhindern, dass es dadurch zur Synthese von trunkierten Proteinen kommt, besitzt die Zelle einen Mechanismus für die Qualitätskontrolle der mRNA, der als *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) bezeichnet wird (Maquat, 1995). Dabei wird die mRNA während der ersten Runde der Translation durch das erste translatierende Ribosom auf derartige PTCs hin untersucht. Trifft das Ribosom auf ein PTC, so kommt es zum Stopp der Translation und zur Degradation der mRNA (Conti und Izaurralde, 2005; Lejeune et al., 2004; Nicholson und Muhlemann, 2010). Voraussetzung für die Aktivierung des NMD-Mechanismus ist die Anwesenheit von Proteinen an den Exon-Exon-Verbindungsstellen, die nach dem Spleißen auf der mRNA verbleiben (Le Hir et al., 2001). NMD wird in der Regel nur initiiert, wenn das verfrühte Stop-Codon mindestens 50-55 Nukleotide stromaufwärts des letzten EJC liegt (Maquat, 2004; Nagy und Maquat, 1998).

2.6 Die Proteindegradation

In eukaryotischen Zellen erfolgt die Spaltung von Proteinen in Peptide für die Antigenpräsentation in der Regel entweder durch proteasomalen oder lysosomalen Abbau. Welchem Abbauweg ein Protein unterliegt, hängt in erster Linie von seiner Lokalisation ab. Für die Präsentation von intrazellulären Antigenen auf MHC-Klasse-I ist der proteasomale Abbau von entscheidender Bedeutung.

2.6.1 Proteasomale Proteindegradation

Peptide für die Präsentation auf MHC-Klasse-I werden überwiegend durch proteasomalen Abbau generiert. Der Zusammenhang zwischen Proteasom und MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation konnte durch den Einsatz von proteasomalen Inhibitoren gezeigt

werden. Nach Hemmung des Proteasoms war die Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I deutlich vermindert (Rock et al., 1994).

Im Gegensatz zum Lysosom handelt es sich beim Proteasom um kein Zellkompartiment, sondern einen Multiproteinkomplex bestehend aus zwei Hauptkomponenten. Diese werden entsprechend ihrer Sedimentationskoeffizienten als 20S-Core-Proteasom und 19S-CAP-Struktur bezeichnet, wobei die 19S-CAP-Strukturen doppelt vorkommen und das 20S-Core-Proteasom von beiden Seiten bedecken (Voges et al., 1999). Das 20S-Core-Proteasom ist aus vier Ringen aufgebaut, welche sich aus sieben weiteren Untereinheiten zusammensetzen. Durch diese Ringe erhält das Core-Proteasom eine zylindrische Form. Bei den Untereinheiten der Ringe handelt es sich entweder um α - oder β -Untereinheiten, wobei die α -Untereinheiten die beiden äußeren Ringe bilden. Die β -Untereinheiten hingegen bilden die beiden inneren Ringe und verleihen dem 20S-Core-Proteasom seine katalytische Aktivität. Die sieben β -Untereinheiten, welche über eine katalytische Aktivität verfügen, besitzen unterschiedliche Spezifitäten (Xie, 2010). Somit kann das Proteasom Proteine mit unterschiedlicher Spezifität spalten. $\beta 1$ spaltet die Proteine nach sauren Aminosäuren (Caspase-ähnliche Aktivität), $\beta 2$ nach basischen Aminosäuren (Trypsin-ähnliche Aktivität) und $\beta 5$ nach hydrophoben Aminosäuren (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität) (Coux et al., 1996).

Die 19S-CAP-Strukturen bestehen aus zwei Untereinheiten, die als *Base* und *Lid* bezeichnet werden. Beide Untereinheiten verfügen über regulatorische Funktionen. Während die *Lid*-Untereinheit Proteine erkennt und bindet, die für den proteasomalen Abbau markiert sind, ist die *Base*-Untereinheit dafür zuständig, die aufgenommenen Proteine zu entfalten und in den Zylinder des 20S-Core-Proteasoms einzuführen (Strehl et al., 2005). Für den Entfaltungsprozess ist Energie erforderlich, die durch die Hydrolyse von ATP in der 19S-CAP-Struktur bereitgestellt wird (Lam et al., 2002).

Nach der proteasomalen Spaltung werden die generierten Peptide entweder direkt oder nach Prozessierung durch zytoplasmatische Aminopeptidasen mittels TAP ATP-abhängig ins ER transportiert. Dort kann eine weitere N-terminale Prozessierung durch die im ER-Lumen lokalisierte Aminopeptidase ERAAP erfolgen (Saric et al., 2002; Serwold et al., 2002).

2.6.2 Das Immunproteasom

Das immunmodulatorische Zytokin IFN- γ wird von aktivierten T_H1 Helferzellen, CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen produziert. Nach seiner Sekretion bindet IFN- γ an seinen spezifischen Rezeptor auf Zielzellen und induziert die Expression IFN- γ -induzierbarer Gene (Gaczynska et al., 1993; Tanaka, 1994), wozu auch die Untereinheiten β 1i, β 2i und β 5i des Immunproteasoms gehören. Nach ihrer Expression werden sie bei der *de-novo* Synthese der Proteasomen alternativ zu den konventionellen Untereinheiten β 1, β 2 und β 5 eingebaut. Das dabei entstehende Proteasom wird als Immunproteasom bezeichnet (Aki et al., 1994; Groettrup et al., 2010). Da diese Untereinheiten katalytische Aktivität besitzen, wird durch diese Substitution die proteolytische Spezifität modifiziert (Toes et al., 2001). Das Immunproteasom spaltet präferentiell nach hydrophoben und basischen Aminosäuren (Driscoll et al., 1993). Die so generierten Peptide werden mit höherer Affinität von TAP transportiert und letztlich von MHC-Klasse-I-Molekülen gebunden. Der Nutzen des Immunproteasoms liegt also darin, optimierte Peptide für die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation zu generieren (Strehl et al., 2005).

2.6.3 Proteindegradation durch die Tripeptidyl-Aminopeptidase II (TPPII)

Zusätzlich zur proteasomalen Degradation ist ein Proteinabbau auch durch die Tripeptidyl Aminopeptidase II (TPPII) möglich. Bei TPPII handelt es sich um eine zytoplasmatische Protease, die sich aus multiplen Untereinheiten zusammensetzt. Die Aktivierung von TPPII erfolgt autokatalytisch. Die Substrate werden endoproteolytisch nach Lysin-Resten gespalten, wobei die dabei entstehenden Peptide, wie nach proteasomaler Degradation, für die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation verwendet werden (Kloetzel, 2004). Die Substratspezifität von TPPII ist nicht begrenzt auf nur ein bestimmtes Zielprotein. Da die TPPII aber nicht wahllos alle Proteine spalten kann und meist die nachfolgende Prozessierung von proteasomalen Degradationsprodukten übernimmt, ist sie nicht in der Lage, die Funktion des Proteasoms in der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation zu ersetzen (Anton und Villasevil, 2008; Rock et al., 2010). Dennoch existieren Antigene, die nicht nur durch das Proteasom, sondern alternativ auch durch TPPII generiert werden können (Herberts et al., 2003; Seifert et al., 2003).

2.6.4 Ubiquitynylierung

Die proteasomale Degradation von Proteinen dient nicht nur der Antigenpräsentation, sondern ist von zentraler Bedeutung für die Proteinhomöostase der Zelle. Hierfür ist es notwendig, dass enorme Mengen an Proteinen zu definierten Zeitpunkten abgebaut werden. Dazu werden Proteine, die für den proteasomalen Abbau vorgesehen sind, mit Ubiquitin markiert (Glickman und Ciechanover, 2002; Hershko und Ciechanover, 1998). Ubiquitin ist ein kleines Protein bestehend aus 76 Aminosäuren. Die Ubiquitynylierung von Proteinen ist nicht nur ein Signal für deren Abbau, sondern dient auch als Signal für Proteintransport oder Proteintranslokation und ist an der Regulation von Transkription, Signaltransduktion sowie DNA-Reparaturmechanismen beteiligt (Bergink und Jentsch, 2009; Bianchi und Meier, 2009). Welche Signale die Ubiquitin-Markierung vermitteln, ist abhängig von der Art der Verknüpfung. Ubiquitin-Modifikationen können beispielsweise in Form von Mono-Ubiquitynylierung, Multi-Ubiquitynylierung oder Poly-Ubiquitynylierung auftreten (Claessen et al., 2012). Wird ein Protein an mehreren Stellen mit jeweils nur einem Ubiquitin-Molekül modifiziert, spricht man von Multi-Ubiquitynylierung. Kommt es jedoch an einer oder mehreren Stellen zur Konjugation einer Ubiquitin-Kette, bestehend aus zwei oder mehr Ubiquitin-Einheiten wird dies als Poly-Ubiquitynylierung bezeichnet. Die Verknüpfung der einzelnen Ubiquitin-Moleküle erfolgt durch Bildung einer Isopeptid-Bindung zwischen einer Lysin-Aminosäure des ersten Ubiquitins mit der C-terminalen Glycin-Aminosäure des nachfolgenden Ubiquitin-Moleküls. Aus diesem Grund spielt bei Poly-Ubiquitinketten die Art der Verknüpfung eine entscheidende Rolle für das Schicksal des modifizierten Proteins. Ubiquitin verfügt über sieben Lysinreste, die als Basis für die Verknüpfung mit einem weiteren Ubiquitin-Molekül fungieren können. Am besten charakterisiert ist die K48 (Lysin 48) und die K63 (Lysin 63) verknüpfte Poly-Ubiquitynylierung. Entscheidend für den proteasomalen Abbau ist eine Markierung des Zielproteins mit einer K48-verknüpften Poly-Ubiquitinkette, bestehend aus mindestens vier Ubiquitin-Monomeren (Deshaies und Joazeiro, 2009; Finley, 2009; Ikeda und Dikic, 2008).

Der Prozess der Ubiquitynylierung wird von drei Enzymen bewerkstelligt: E1, E2 und E3. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 bindet sowohl ein Molekül Ubiquitin als auch ein Molekül ATP und katalysiert die Hydrolyse von ATP, was zur Aktivierung des Ubiquitins führt. Das aktivierte Ubiquitin wird anschließend auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 übertragen. Die Ubiquitin-Ligase E3 katalysiert die letzte Reaktion, bei der das Ubiquitin-

Molekül von E2 auf das entsprechende Zielprotein übertragen wird. E3 besitzt Substratspezifität und bestimmt somit, welches Protein ubiquitinyliert wird. Da ein bestimmtes E3-Enzym nur ein oder wenige Proteine als Substrat erkennt, existieren ca. 700 verschiedene E3-Ubiquitin-Ligasen, um einen Großteil des Proteoms abdecken zu können. Das erste Ubiquitin wird bei der Reaktion reversibel an Lysine, Cysteine, Serine oder Threonine im Zielprotein angehängt (Cadwell und Coscoy, 2005; Shimizu et al., 2010; Wang et al., 2007). Darüber hinaus kann die Ubiquitin-Modifikation auch an der N-terminalen Aminosäure erfolgen (Ciechanover und Ben-Saadon, 2004). Damit eine Poly-Ubiquitinkette entsteht, die das Protein für den proteasomalen Abbau markiert, muss dieser Zyklus mindestens viermal durchlaufen werden, wobei in jedem Zyklus ein Ubiquitin an das bereits vorhandene angehängt wird.

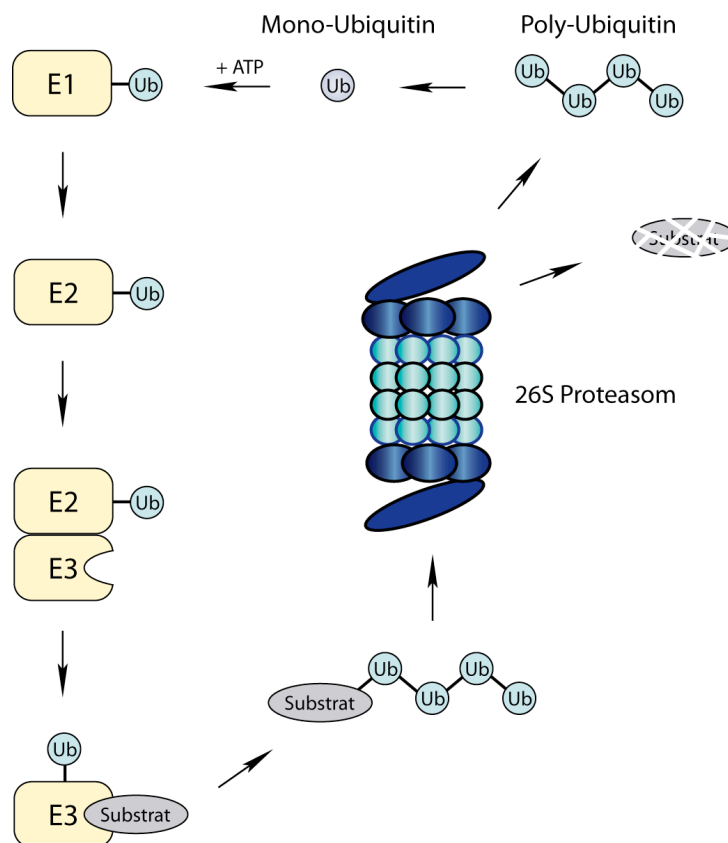


Abbildung 2.3: Das Ubiquitin-Proteasom-System

Die Konjugation von Ubiquitin an ein Substratprotein führt zu dessen proteasomalen Abbau. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 bindet sowohl ein einzelnes Ubiquitin-Molekül als auch ein Molekül ATP. Durch Hydrolyse des ATP kommt es zur Aktivierung des Ubiquitins und somit zur Übertragung des Ubiquitins von E1 auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2. E2 interagiert mit dem dritten

Enzym, der Ubiquitin-Ligase E3, wodurch es erneut zur Übertragung des Ubiquitins kommt. Das E3-Enzym besitzt Substratspezifität und ist somit in der Lage, ein bestimmtes Protein mittels Ubiquitin-Konjugation für den proteasomalen Abbau zu markieren. Bevor es jedoch zur Degradation kommt, muss dieser Zyklus mindestens viermal durchlaufen werden, damit eine Poly-Ubiquitinkette entsteht, die das spezifische Signal für die Proteindegradation darstellt. Nach erfolgreicher Degradation wird die Poly-Ubiquitinkette freigesetzt und von deubiquitylierenden Enzymen erkannt und gebunden. Diese spalten die Ketten wieder in einzelne Ubiquitin-Moleküle, welche erneut in den Zyklus eintreten und für Ubiquitin-Modifikationen von weiteren Proteinen zur Verfügung stehen (Deshaies und Joazeiro, 2009).

2.6.5 Deubiquitylierung

Die Anzahl verschiedener Ubiquitin-modifizierter Proteine ist in der Zelle konstant und beträgt ungefähr vier- bis fünftausend (Kim et al., 2011; Wagner et al., 2011). Um diesen hohen Bedarf an Ubiquitin decken zu können, werden Ubiquitin-Moleküle nach Vollendung ihrer Aufgabe nicht degradiert, sondern zur Wiederverwendung vom Substrat entfernt. Enzyme, die diese Aufgabe erfüllen, werden als deubiquitylierende Enzyme (DUBs) bezeichnet. Sie sorgen dafür, dass Ubiquitinketten vom Protein abgespalten und die Ketten in die einzelnen Ubiquitin-Moleküle zerlegt werden (Amerik und Hochstrasser, 2004; Komander et al., 2009). Bislang sind ca. 100 DUBs bekannt, die in fünf Klassen eingeteilt werden: Ubiquitin-spezifische Proteasen (USPs), Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen (UCHs), *Machado-Josephs disease protein domain proteases*, *Ovarian tumor proteases* und JAB1/MPN/Mov34-Metalloproteasen (Reyes-Turcu und Wilkinson, 2009).

2.7 Defekte ribosomale Translationsprodukte - DRiPs

Durch Fehler während der Genexpression entstehen defekte Proteine, die ihre Funktion nicht ausüben können. Fehler während der Transkription führen beispielsweise zu Leserastermutationen oder auch zu inkorrektem Spleißen. Ferner besteht die Möglichkeit,

dass Defekte in der posttranslationalen Modifikation zu einer Missfaltung des Proteins führen (Yewdell, 2011; Yewdell et al., 1996).

Diese nicht-funktionalen Proteine werden als *defective ribosomal products* (DRiPs) bezeichnet und können bis zu 30 Prozent aller neu-synthetisierten Proteine ausmachen (Schubert et al., 2000). DRiPs besitzen eine sehr kurze Halbwertszeit ($t_{1/2} < 10$ min) und werden rasch nach ihrer Synthese wieder durch das Proteasom abgebaut (Princiotta et al., 2003).

Untersuchungen zur Antigenpräsentation, in denen die Proteinsynthese oder die Proteindegradation durch Zugabe chemischer Inhibitoren blockiert wurde, haben gezeigt, dass Peptide, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, aus der DRiP-Fraktion stammen.

In einem wegweisenden Experiment von Yewdell und Mitarbeitern wurden die antigenpräsentierenden Zellen zunächst mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt, was zu einer Abnahme der Antigenpräsentation führte, da keine Peptide mehr generiert wurden (Qian et al., 2006a). Anschließend wurde der Inhibitor MG132 wieder entfernt und zeitgleich der Translations-Inhibitor Cycloheximid (CHX) zugegeben, um eine Neusynthese von Proteinen zu unterbinden. Durch fortwährende Messung des Antigenpräsentationsniveaus konnte gezeigt werden, dass nach Reaktivierung des Proteasoms die Antigenpräsentation bereits nach 60 Minuten wieder anstieg. Anhand dieser Experimente konnte veranschaulicht werden, dass auch nach der Inhibition der Translation Peptide generiert und präsentiert wurden. Da es innerhalb von 60 Minuten erneut zu einem Anstieg der Antigenpräsentation kam, mussten die in diesem Fall präsentierten Peptide in kürzester Zeit generiert worden sein. Um diese Proteine derart schnell abbauen zu können, müssen diese eine sehr kurze Halbwertszeit aufweisen. Da aber das in den Experimenten verwendete Modellantigen eine weitaus längere Halbwertszeit besaß, mussten die präsentierten Peptide von instabilen Translationsprodukten, wie etwa von DRiPs, abstammen (Apcher et al., 2012; Dolan et al., 2011a; Qian et al., 2006b).

Diesen Ergebnissen zufolge muss die Generierung von Substraten für die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation unmittelbar mit der Proteinsynthese gekoppelt sein (Cardinaud et al., 2010; Khan et al., 2001; Reits et al., 2000).

2.8 Fragestellung

Basierend auf den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen wird davon ausgegangen, dass die Hauptquelle von MHC-Klasse-I-Antigenen neu synthetisierte Proteine mit äußerst kurzer Halbwertszeit sind, welche als DRiPs bezeichnet werden (Qian et al., 2006b; Yewdell et al., 1996). Ob und inwiefern jedoch auch mature Proteine zur MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation beitragen, wurde bislang jedoch nicht im Detail untersucht (Engelhard et al., 2006). Neben der Translation nimmt auch die proteasomale Degradation eine zentrale Rolle in diesem Antigenpräsentationsweg ein. Aufgrund von Erkenntnissen um den proteasomalen Proteinabbau und dessen Zusammenspiel mit der Ubiquitinylierung liegt es nahe, dass die Ubiquitinylierung auch bei der Prozessierung und Präsentation von Antigenen eine entscheidende Position einnimmt (Hershko und Ciechanover, 1998; Rock et al., 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher durch den Einsatz von Fusionsproteinen, die in ihrer Stabilität moduliert werden können, der Beitrag maturer Proteine zur MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation untersucht werden. Ferner sollte die Generierung von Antigenen näher charakterisiert werden. Dies beinhaltete die Analyse verschiedener Aspekte der mRNA-Translation, wie zum Beispiel die mRNA-Stabilität, die subzelluläre Lokalisation der Proteinsynthese und Mechanismen der Translationsinitiation. Zudem sollte die Rolle der Ubiquitinylierung in der Proteasom-abhängigen Generierung von MHC-Klasse-I-Antigenen, durch Verwendung von Mutanten, die keine Ubiquitin-Modifikation erlauben, untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten mehr Aufschluss über die Funktionsweise der Prozessierung von MHC-Klasse-I-Antigenen geben.

3. MATERIAL

3.1 Zelllinien

Tabelle 3.1: HLA-Genotyp der verwendeten Zelllinien

Linie	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DPB1
HEK293T	0201	0702			0602	
DG75	0201; 6601	4101; 5001	0602; 17	0404; 1301	0402; 0603	0401
KMH2	1101; 2401	1501; 5201	0401; 1202	0401; 1101	0301; 0505	0201; 0501
LCL1.11	0201; 6601	1801, 4102	1203, 1701	1501; 1303	0602; 0301;	0301; 0402
LCL-MSC	2601; 6801	1801; 3502	0701; 0701	1501	0602; 0603	0401

Tabelle 3.2: Spezifität und Restriktion der verwendeten CD8⁺ T-Zellen

T-Zelllinie	Antigen	Epitop	HLA-Restriktion
JM	BRLF1	AA ₁₀₉₋₁₁₈ -YVLDHLIVV	HLA-A*0201
FL	BZLF1	AA ₁₉₀₋₁₉₇ -RAKFKQLL	HLA-B*0801
LG	BZLF1	AA ₁₂₂₋₁₃₁ -VQTAAAVVF	HLA-B*1501
SJ	EBNA1	AA ₄₁₁₋₄₂₀ -HPVGEADYF	HLA-B*3501
CR	EBNA1	AA ₄₁₁₋₄₂₀ -HPVGEADYF	HLA-B*3501

3.2 Plasmide

Tabelle 3.3: Erstellte Plasmide

Plasmid	Eigenschaft
Tet-Ery-NGFR-PTuner-BRLF1-GFP	Das <i>PTuner-BRLF1-GFP</i> -Fusionsgen wie auch das <i>NGFR</i> -Gen stehen unter der Kontrolle eines bidirektionalen Tetrazyklin-regulierbaren Promotors
Tet-Ery-NGFR-PTuner-BRLF1-IRES-GFP	Das <i>PTuner-BRLF1-IRES-GFP</i> -Fusionsgen wie auch das <i>NGFR</i> -Gen stehen unter der Kontrolle eines bidirektionalen Tetrazyklin-regulierbaren Promotors
Tet-Ery-NGFR-PTuner-EBNA1-GFP	Das <i>PTuner-EBNA1-GFP</i> -Fusionsgen wie auch das <i>NGFR</i> -Gen stehen unter der Kontrolle eines bidirektionalen Tetrazyklin-regulierbaren Promotors
Tet-Ery-NGFR-PTuner-EBNA1ΔGA-GFP	Das <i>PTuner-EBNA1ΔGA-GFP</i> -Fusionsgen wie auch das <i>NGFR</i> -Gen stehen unter der Kontrolle eines bidirektionalen Tetrazyklin-regulierbaren Promotors
Tet-Ery-NGFR-PTuner-EBNA1ΔGA-IRES-GFP	Das <i>PTuner-EBNA1ΔGA-IRES-GFP</i> -Fusionsgen wie auch das <i>NGFR</i> -Gen stehen unter der Kontrolle eines bidirektionalen Tetrazyklin-regulierbaren Promotors
pCMV-BZLF1-EHis	Wildtyp-BZLF1 Expressionsplasmid mit C-terminaler Fusion eines EBNA1- als auch eines His ₆ -Etiketts
pCMV-BZLF1+YVL-EHis	C-terminale Fusion des BRLF1-YVL-Epitops an den offenen Leserahmen von BZLF1
pCMV-BZLF1ΔIntron	cDNA-Sequenz von BZLF1, enthält kein Intron und erfordert daher kein Spleißen der mRNA
pCMV-BZLF1+PTC	Eingeführte Punktmutation bewirkt einen verfrühten Translationsabbruch
pCMV-BZLF1+PTCΔIntron	cDNA-Sequenz von BZLF1+PTC, enthält keine Introns und erfordert daher kein Spleißen der mRNA
pCMV-BZLF1+β-Globin-3'UTR	Fusion des <i>BZLF1</i> -Gens mit der 3'UTR von β-Globin
pCMV-BZLF1+IFN-γ-3'UTR	Fusion des <i>BZLF1</i> -Gens mit der 3'UTR von IFN-γ
pCMV-BZLF1+β-Aktin-3'UTR	Fusion des <i>BZLF1</i> -Gens mit der 3'UTR von β-Aktin
pCMV-BZLF1+β-Aktin-3'UTR-mut	Fusion des <i>BZLF1</i> -Gens mit der 3'UTR von β-Aktin; in dem die ZBP1-Bindedomäne mutiert war
pCMV-BZLF1-IRES-GFP	Die <i>BZLF1</i> - und <i>GFP</i> -Gensequenzen sind durch eine IRES-Sequenz getrennt
pCMV-GFP-IRES-BZLF1	Die <i>GFP</i> - und <i>BZLF1</i> -Sequenzen sind durch eine IRES-Sequenz getrennt

pCMV-BNLF2a-His	Wildtyp-BNLF2a Expressionsplasmid mit C-terminaler Fusion des His ₆ -Etiketts
PCMV-BNLF2a+2xGFP	Fusion von BNLF2a mit zwei Molekülen GFP
pCMV-BNLF2a+2xGFP-Nuc	Fusion von BNLF2a mit zwei Molekülen GFP sowie einem Kern-Lokalisationssignal
pGEM4Z-BZLF1-A116	Das Wildtyp- <i>BZLF1</i> -Gen steht unter der Kontrolle des T7-Promotors zur Synthese von in vitro transkribierter RNA
pGEM4Z-BZLF1+PTC-A116	Das <i>BZLF1+PTC</i> -Gen steht unter der Kontrolle des T7-Promotors zur Synthese von in vitro transkribierter RNA
pGEM4Z-GFP-A116	Das <i>GFP</i> -Gen steht unter der Kontrolle des T7-Promotors zur Synthese von in vitro transkribierter RNA
pCMV-EBNA1-His	Wildtyp-EBNA1 Expressionsplasmid mit C-terminaler Fusion des His ₆ -Etiketts
pCMV-EBNA1ΔGA-His	Expressionsplasmid der Deletionsmutante EBNA1ΔGA mit C-terminaler Fusion des His ₆ -Etiketts
pCMV-BZLF1-ΔK	Substitution aller Lysine des BZLF1-Genprodukts durch Arginine
pCMV-BZLF1-ΔC	Substitution aller Cysteine des BZLF1-Genprodukts durch Alanine
pCMV-BZLF1ΔKC	Substitution aller Lysine und Cysteine des BZLF1-Genprodukts durch Arginine bzw. Alanine
pCMV-BZLF1-ΔS	Substitution aller Serine des BZLF1-Genprodukts durch Alanine
pCMV-BZLF1-ΔT	Substitution aller Threonine des BZLF1-Genprodukts durch Alanine
pCMV-BZLF1-mut-I+YVL	BZLF1 enthält aufgrund von Punktmutationen nur noch 19 der ursprünglich 41 CKST-Aminosäuren
pCMV-BZLF1-mut-II+YVL	BZLF1 enthält aufgrund von Punktmutationen nur noch 9 der ursprünglich 41 CKST-Aminosäuren
pCMV-BZLF1-mut-III+YVL	BZLF1 enthält aufgrund von Punktmutationen nur noch 3 der ursprünglich 41 CKST-Aminosäuren
pCMV-BZLF1-ΔCKST+YVL	BZLF1 enthält aufgrund von Punktmutationen keinerlei CKST-Aminosäuren
pCMV-MART1+YVL-EHis	C-terminale Fusion des BZLF1-YVL-Epitops als auch eines EBNA1- und eines His ₆ -Etiketts an den offenen Leserahmen von des <i>MART-1</i> -Gens
pCMV-MART1-mut-I+YVL	MART-1 enthält aufgrund von Punktmutationen nur noch 17 der ursprünglich 23 CKST-Aminosäuren

pCMV-MART1-mut-II+YVL	MART-1 enthält aufgrund von Punktmutationen nur noch 10 der ursprünglich 23 CKST-Aminosäuren
pCMV-MART1-mut-III+YVL	MART-1 enthält aufgrund von Punktmutationen nur noch 1 der ursprünglich 23 CKST-Aminosäuren
pCMV-MART1-ΔCKST+YVL	MART-1 enthält aufgrund von Punktmutationen keinerlei CKST-Aminosäuren
pCMV-ApoB-BZLF1+YVL-EHis	N-terminale Fusion von Wildtyp-BZLF1 mit der ER-Signalsequenz von ApolipoproteinB
pCMV-ApoB-BZLF1-ΔCKST+YVL-EHis	N-terminale Fusion von BZLF1-ΔCKST mit der ER-Signalsequenz von ApolipoproteinB
pCMV-ApoB-BZLF1-GFP	N-terminale Fusion von Wildtyp-BZLF1 mit der ER-Signalsequenz von ApolipoproteinB und C-terminale Fusion mit GFP
pCMV-ApoB-BZLF1-ΔCKST-GFP	N-terminale Fusion von BZLF1-ΔCKST mit der ER-Signalsequenz von ApolipoproteinB und C-terminale Fusion mit GFP
pCMV-HRD1	Wildtyp-HRD1
pCMV-dnHRD1	Punktmutation in HRD1 führt zu einem dominant negativen Effekt nach Expression
pCMV-YVL-Epitop	Expression des BRLF1-Epitops YVLDHLIVV als Minigen
pCMV-VQT-Epitop	Expression des BZLF1-Epitops VQTAAAVVF als Minigen
pCMV-Ubiquitin	Wildtyp-Ubiquitin
pCMV-Ub-K33R	Punktmutation führte zur Substitution des Lysins an Position 33 durch ein Arginin
pCMV-Ub-K48R	Punktmutation führte zur Substitution des Lysins an Position 48 durch ein Arginin

3.3 Bakterienstämme

In allen Versuchen wurde ausschließlich der *Escherichia coli*-Stamm XL1-blue MRF⁺ (Stratagene) verwendet.

3.4 Expressionsplasmide

Siehe Anhang: Vektorkarten

3.5 Antikörper

3.5.1 Primärantikörper

Tabelle 3.4: Primärantikörper

Ungekoppelte Primärantikörper			
Spezifität	Wirt	Anwendung	Firma
anti-BRLF1	Maus	Western-Blot	Argene
anti-BZLF1	Maus	Western-Blot	Argene
anti-EBNA1	Ratte	Western-Blot	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von Dr. E. Kremmer (HMGU, München)
anti-GAPDH	Maus	Western-Blot	Millipore
anti-His ₆	Maus	Western-Blot	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von Dr. E. Kremmer (HMGU, München)
anti-NGFR	Maus	MACS	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von Dr. E. Kremmer (HMGU, München)
anti-Tubulin	Kaninchen	Western Blot	Argene

3.5.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3.5: Gekoppelte Sekundärantikörper

Sekundärantikörper			
Spezifität	Wirt	Kopplung	Firma
anti-Maus-IgG	Schaf	HRP	Amersham
anti-Ratte-IgG + -IgM	Ziege	HRP	Jackson
anti-Kaninchen-IgG	Ziege	HRP	Jackson
anti-Maus-IgG	Esel	IR Dye800 CW Conjugated	Rockland
anti-Ratte-IgG	Kaninchen	IR Dye800 CW Conjugated	Rockland
anti-Maus-IgG	Ziege	IgG Micro-Beads	Miltenyi Biotec

3.6 Reagenzien

Chemikalien, Reagenzien und Enzyme wurden von den Firmen Becton-Dickinson, BioRad, Calbiochem, Clontech, Corning, Eppendorf, GE-Healthcare, Greiner, Integra, Invitrogen, LC Laboratories, MBI-Fermentas, Merck, Millipore, New England Biolabs, Neolab, Nunc, PAA, Packard Instruments, Perkin Elmer, Promega, Qiagen, Roche, Santa Cruz, Sartorius, Sigma-Aldrich und Stratagene bezogen. Weitere Bezugsquellen sind in den einzelnen Methodenbeschreibungen aufgeführt.

3.7 DNA-modifizierende Enzyme

Alle verwendeten DNA-modifizierenden Enzyme wie Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerasen und CIP (*calf intestine phosphatase*), wurden von den Firmen New England Biolabs und MBI Fermentas bezogen.

3.8 Medien und Puffer

3.8.1 Zellkulturmedien

Tabelle 3.6: Zellkulturmedien

DMEM-Komplettmedium (Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium)	DMEM
	10 % FCS
	2 mM L-Glutamin
	1 % Fungizone
	50 µg/mL Gentamycin
RPMI1640-Komplettmedium	RPMI1640
	10 % FCS
	2 mM L-Glutamin
	1 % Fungizone
	50 µg/mL Gentamycin
	1 mM Pyruvat
	1 % nicht-essentielle Aminosäuren

T-Zell-Medium	AIM-V 10 % humanes Serum 2 mM L-Glutamin 10 mM Hepes 50 µg/mL Gentamycin Optional 10 U/ml IL-2
----------------------	---

3.8.2 Allgemeine Puffer und Medien

Tabelle 3.7: Allgemeine Puffer und Medien

ELISA-Blockpuffer	PBS 1 % BSA 5 % Sucrose 0,05 % NaN ₃
ELISA-Waschpuffer	PBS 0,05 % Tween-20
FACS-Puffer	PBS 2 % FCS 0,05 % NaN ₃
Luria-Bertani (LB)-Medium	10 g NaCl 10 g Tryton 5 g Hefe-Extrakt ad 1L H ₂ O dest. autoklaviert
MACS-Puffer	PBS 1 % BSA 2 mM EDTA
PBS	154 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Reagent Diluent (RD)	PBS 1 % BSA sterilfiltrieren
SOB Medium	20 g Tryton 5 g Hefe-Extrakt

	0,5 g NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ ad 1L H ₂ O dest. autoklaviert
SOC Medium	SOB-Medium 0,2 % Glucose sterilfiltriert
Strip-Puffer	13,1 ml 1 M Zitronensäure 6,6 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ ad 100 ml PBS pH 3,1
Superbroth Medium	32 g Tryton 20 g Hefe-Extrakt 25 g NaCl ad 1l H ₂ O dest. autoklaviert
TAE	40 mM Tris/HCl pH 7,8 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA
TBS	50 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,4
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH7,5 1 mM EDTA in H ₂ O

3.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Bakterieninkubator	Heraeus
Bestrahlungsanlage Gammacell 40 mit Cäsium-137	AECL
Biophotometer Plus	Eppendorf
Brutschrank	Heraeus; ThermoForma
Elektrophoresekammer	Invitrogen
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	BioRad
ELISA-Reader	TECAN Sunrise
FACS Calibur	Becton-Dickinson
Falcon-Roller	Coulter Electronics Limited
Gefrierschrank -80°C	Colora
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Kühlschrank	Liebherr
Lichtmikroskop Axioskop	Zeiss
LightCycler 2.0	Roche
Millipore-Anlage	Millipore
Netzgerät Power PAC 300	Bio-Rad
Neubauer-Zählkammer	GLW
Odyssey Infrarot Gerät	LI-COR
pH-Messgerät	Knick
Pipetten	Gilson
Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Schüttelinkubatoren	New Brunswick Scientific
Spektrophotometer	Eppendorf
Sterilbank	Bio Flow Technik
UV-Transilluminator	UVP Inc.
Vortex Genie 2	Bender & Hobein
Zentrifugen	Eppendorf, Sorvall, Beckman, Hettich

4. METHODEN

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 DNA-Klonierung

Die DNA-Klonierung stellt eine Methode dar, die es erlaubt, ein spezifisches DNA-Fragment in einen Klonierungsvektor einzufügen. Als bevorzugte Klonierungsvektoren werden dazu Plasmide verwendet. Bestimmte Sequenzabschnitte der Plasmide, sogenannte *multiple cloning sites* (MCS), erlauben ein spezifisches Schneiden und Ligieren des Vektors. Sobald das DNA-Fragment in den Vektor eingefügt wurde, kann der nun rekombinante Klonierungsvektor mittels Transformation in Bakterien eingebracht werden. Neben dem Zielgen enthält das rekombinante Plasmid zudem ein Gen, das als Selektionsmarker verwendet werden kann. Dabei handelt es sich meist um ein Antibiotika-Resistenzgen. Dieser Marker kann zur Überprüfung verwendet werden, welche Bakterien erfolgreich mit dem rekombinanten Vektor transformiert wurden.

Das Aufspalten der Plasmid-DNA und das Herausschneiden des DNA-*inserts* erfolgt sequenzspezifisch durch sogenannte Restriktionsendonukleasen. Diese erkennen eine bestimmte Basenabfolge und spalten die doppelsträngige DNA. Abhängig vom verwendeten Restriktionsenzym hinterlässt dieses an den Spaltstellen entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder überhängende Enden (*sticky ends*). Im optimalen Fall sollten der Vektor und das *insert* mit demselben Restriktionsenzym gespalten werden, was eine komplementäre Basenpaarung zwischen Vektor und *insert* ermöglicht und die Verknüpfung der beiden Moleküle erleichtert. Diese Reaktion wird durch das Enzym DNA-Ligase katalysiert. Da das Plasmid für ein Antibiotika-Resistenzgen kodiert, können Bakterien, die das rekombinante Plasmid aufgenommen haben, auf Antibiotika-haltigem Agar überleben und wachsen.

4.1.1.1 Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten DNA sequenzspezifisch. Diese Enzyme erkennen bevorzugt palindromische Sequenzabfolgen der DNA und katalysieren die Hydrolyse der

Phosphodiesterbindungen beider DNA-Stränge. Abhängig vom verwendeten Restriktionsenzym entstehen auf beiden Seiten der Spaltstelle entweder glatte DNA-Enden (*blunt ends*) oder überhängende DNA-Enden (*sticky ends*), die im Bereich des Überhangs einzelsträngig vorliegen. Der Restriktionsverdau erfolgte gemäß den Herstellerangaben der verwendeten Enzyme. In aller Regel handelte es sich jedoch um Enzyme, die bei 37°C aktiv sind. Die Inkubationszeit betrug bei entsprechender Temperatur 1 - 2 Stunden (h).

Tabelle 4.1: Reaktionsansatz für den DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

DNA	1 µg
10x Puffer	2 µl
Enzym	1 µl
H ₂ O ad	20 µl

4.1.1.2 Synthese von glatten Enden nach dem Restriktionsverdau

Im Fall, dass glatte DNA-Enden für die DNA-Klonierung benötigt wurden, aber nur geeignete Spaltstellen für Enzyme vorhanden waren, die überhängende Enden hinterließen, wurden aus den Überhängen glatte Enden generiert. Dazu wurden direkt nach dem Verdau der Plasmid-DNA Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTP) und T4 DNA-Polymerase zum Reaktionsansatz zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend für 10 - 15 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, wobei die T4-DNA-Polymerase anhand der dNTPs die einzelsträngigen Bereiche komplementär auffüllte, bis ein glattes Ende der DNA erreicht war. Außerdem verfügt das Enzym ebenso über eine Exonuklease-Aktivität, die dazu führt, dass einzelsträngige Bereiche der DNA in 3'-5'-Richtung abgebaut werden. Diese Aktivität wurde ebenso zur Generierung von glatten Enden benutzt, vorausgesetzt bei den Überhängen handelte es sich um 3'-Überhänge. Dabei wurden diese Überhänge durch die T4-DNA-Polymerase soweit abgespalten bis sich wiederum glatte DNA-Enden ergaben. Um zu verhindern, dass diese enzymatische Aktivität unspezifisch DNA spaltet, hervorgerufen durch längere Inkubationszeiten beziehungsweise nach Erschöpfung der dNTP-Reserven, war es erforderlich, das Enzym durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion zu inaktivieren.

Tabelle 4.2: Reaktionsansatz zur Synthese von glatten Enden mit T4 DNA-Polymerase

Ansatz Restriktionsverdau	20 µl
dNTP (je 10 mmol)	1 µl
T4 DNA-Polymerase (5 U/µl)	1 µl

4.1.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Enzyme, wie die T4 DNA-Polymerase, zu inaktivieren, oder die DNA von Puffer-Rückständen zu reinigen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde direkt nach der Enzymreaktion das äquivalente Volumen eines Phenol/Chloroform-Gemisches (1:1) zugegeben und der Ansatz gemischt. Anschließend wurde der Ansatz für 20 Min bei 18.000 x g und 4°C zentrifugiert, was zu einer Trennung in eine obere, wässrige und eine untere, Phenol-haltige Phase führte. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol versetzt. Nach erneuter Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen, wurde der DNA-Niederschlag getrocknet und anschließend in Wasser gelöst.

4.1.1.4 Extraktion der DNA-Fragmente aus einem Agarosegel

Um das entsprechende DNA-Fragment aus dem Restriktionsansatz zu isolieren, wurde der gesamte Ansatz in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurden die DNA-Fragmente durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht sichtbar gemacht, die DNA-Bande der entsprechenden Größe ausgeschnitten und die DNA daraus aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurde der Restriktionsansatz mit Ladepuffer versetzt und in eine große Tasche eines Agarosegels geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 Volt für ca. 1 - 2 h. Im Agarosegel war Ethidiumbromid enthalten, das in die DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Um eine eventuelle Mutagenese der DNA zu unterbinden, wurde zur Detektion der Banden langwelliges UV-Licht (Wellenlänge $\lambda=365$ nm) verwendet. Um die DNA aus dem Gelstück zu isolieren, wurde der peqGOLD-Gel-Extraktions-Kit der Firma Peqlab verwendet. Nach der Gewichtsbestimmung des ausgeschnittenen Gelstücks wurde das äquivalente Volumen an XP2 Binde-Puffer zugesetzt, das Reaktionsgefäß auf 60°C erhitzt

und von Zeit zu Zeit gevortext. Nachdem sich das Gelstück vollständig im Puffer aufgelöst hatte, wurde die Lösung auf spezielle Säulen geladen und für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert, wobei der Durchlauf verworfen wurde. Durch Zugabe von zweimal je 600 µl SPW-Waschpuffer und anschließender Zentrifugation für 1 Minute bei 10.000 x g wurde die in der Säulenmatrix gebundene DNA gewaschen. Um die DNA von der Säule zu eluieren, wurde die Säule in eines neues Reaktionsgefäß platziert, 30 µl ddH₂O auf die Säule gegeben und erneut für 1 Minute bei 5.000 x g zentrifugiert.

Daraufhin wurde ein Aliquot der isolierten DNA mit DNA-Ladepuffer versetzt und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand der Bandengröße wurde überprüft, ob es sich um das gewünschte DNA-Fragment handelte. Zudem konnte durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der DNA-Bande mit der Intensität der Markerbanden die Konzentration der isolierten DNA abgeschätzt werden.

4.1.1.5 Ligation

Vektor- und *insert*-DNA wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase zu einem neuen rekombinanten geschlossenen DNA-Ring verbunden. Das Enzym DNA-Ligase katalysiert dabei die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den DNA-Enden von Vektor und *insert*. Für diese Reaktion wurde die Vektor- und *insert*-DNA im Verhältnis 1:3 miteinander vermischt und sowohl T4 DNA-Ligase als auch entsprechender Puffer zugegeben. Die Reaktion erfolgte für 3 - 4 h bei 12°C im Wasserbad.

Tabelle 4.3: Reaktionsansatz der Ligation

Vektor-DNA	2 µl
<i>Insert</i> -DNA	6 µl
10x T4 DNA-Ligase Puffer	1 µl
T4 DNA-Ligase (40 U/µl)	1 µl

4.1.1.6 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel bietet die Möglichkeit, DNA-Fragmente eines Gemisches der Größe nach aufzutrennen. Dazu wurde die DNA zunächst mit DNA-Ladepuffer versetzt. Dieser enthielt Glycerin, welches das gesamte Gemisch beschwert, damit dieses in den Taschen des Agarosegels verbleibt und nicht in den umgebenden Puffer diffundiert. Zudem war im Ladepuffer Bromphenolblau enthalten, wodurch der Verlauf der Elektrophorese visuell nachverfolgt werden konnte. Zudem wurde in eine Tasche des Gels eine Referenzprobe (Marker) bekannter Bandengrößen aufgetragen, anhand deren die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden konnte. In allen Versuchen wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurden 4 g Agarose abgewogen und diese in 400 ml 1 x TAE-Laufpuffer aufgenommen, und das Gemisch in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Nachdem die Lösung auf ca. 50 - 60°C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,2 µg/ml) zugegeben, vorsichtig gemischt und in die vorbereitete Gel-Gießapparatur gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in 1 x TAE-Puffer überführt. Sowohl die DNA-Proben als auch der DNA-Marker wurden in die dafür vorgesehenen Taschen des Gels pipettiert, und anschließend eine Spannung von 120 Volt angelegt. DNA ist auf Grund des Phosphatrückgrates negativ geladen und wandert daher in Richtung des Pluspols, wobei die Geschwindigkeit invers mit der Größe der DNA-Fragmente korreliert. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen der DNA musste diese im Gel sichtbar gemacht werden. Dies geschah durch Bestrahlung mit UV-Licht (Wellenlänge $\lambda=254$ nm). Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht.

TAE-Puffer:

40 mM Tris/HCl pH 7.8; 5 mM NaAc; 1 mM EDTA

Ladepuffer:

10 mM Tris/HCl pH 7.5; 10 mM EDTA; 0,05 % Bromphenolblau; 10 % Glycerin

4.1.2 Amplifikation von Plasmid-DNA mit Hilfe von Bakterienkulturen

4.1.2.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Um eine Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA durchführen zu können, mussten diese entsprechend vorbereitet werden. Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden 500 ml SOB-Medium mit 10 µg/ml Tetrazyklin versetzt und mit einer Einzelkolonie des Bakterienstamms XL1-blue MRF' angeimpft. In einem 2 l-Erlenmeyerkolben wurde die Kultur solange bei 37°C geschüttelt bis eine OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,7 erreicht war. Die Kultur wurde für 15 min zum Abkühlen auf Eis gestellt und anschließend für 15 min bei 4.800 x g und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 250 ml kalter Glycerin-Lösung (10 % in H₂O) resuspendiert. Die Zentrifugation und Resuspendierung wurde nochmals wiederholt und nach erneuter Zentrifugation das Pellet in 2-4 ml eiskalter 10 %-iger Glycerin-Lösung aufgenommen und Aliquots von je 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dauerhaft bei -80°C gelagert (Chung et al., 1989).

4.1.2.2 Transformation elektrokompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Um eine möglichst große Ausbeute des rekombinanten Plasmids zu erhalten, wurde dieses nach der Ligation in Bakterien eingebracht. Die Transformation der Bakterien erfolgte mittels Elektroporation. Dazu wurden je Transformationsansatz 20 µl der elektrokompetenten XL-1 blue MRF'-Bakterien verwendet. Die Bakterien wurden dazu auf Eis aufgetaut und mit 1 µl des Ligationsansatzes versetzt, gut gemischt und in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,1 cm) überführt. Unverzüglich nach der Transformation bei 1,5 kV, 25 µF und 100 Ω wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium aufgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien für 2 min bei 4.600 x g pelletiert und 700 µl des Überstandes abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde danach im restlichen Volumen von 300 µl resuspendiert und die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin) versehen waren, ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

SOC-Medium:

SOB-Medium; 0,2 % Glucose; sterilfiltriert

4.1.2.3 Isolation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien

Um sicher zu stellen, dass die auf den Agarplatten selektierten Bakterien tatsächlich das rekombinante Plasmid trugen, wurden einzelne Kolonien von den Agarplatten abgenommen und LB-Medium angeimpft. Das LB-Medium enthielt dabei das gleiche Antibiotikum, wie die Agarplatten zuvor. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttler wurden die gewachsenen Bakteriensuspensionen für eine Plasmidisolation herangezogen. Hierzu wurde 1 ml jeder Bakteriensuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien für 2 min bei 4.600 x g abzentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Pellet in 100 µl E1-Suspensionspuffer der Firma Genomed resuspendiert und anschließend 100 µl E2-Lysepuffer zugegeben und für 2 - 3 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl E3-Neutralisationspuffer wurde der Ansatz für 10 min bei 18.000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach dem Lysieren der Bakterien kam es durch die Zentrifugation zur Sedimentierung der zellulären Bestandteile, wobei die Plasmid-DNA im Überstand gelöst blieb. Aus diesem Grund wurde nach der Zentrifugation der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und zum Fällern der DNA 800 µl Ethanol zugegeben. Die gefällte DNA wurde anschließend durch erneute Zentrifugation bei 18.000 x g für 20 min bei 4°C pelletiert. Nachdem der Überstand vollständig entfernt worden war, wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen.

Sobald die DNA vollständig in Lösung übergegangen war, wurde ein Aliquot entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein Restriktionsverdau angesetzt. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde dieser mit DNA-Ladepuffer versetzt und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das verwendete Restriktionsenzym wurde so ausgewählt, dass anhand der Restriktionsfragmente eindeutig festgestellt werden konnte, ob es sich bei dem in den Bakterien replizierte Plasmid um das rekombinante Plasmid handelte, welches das gewünschte *insert* trug.

Puffer E1:

50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

Puffer E2:

200 mM NaOH, 1 % SDS

Puffer E3:

3,1 M Kaliumacetat (pH 5,5)

Tabelle 4.4: Reaktionsansatz des Restriktionsverdau

Plasmid-DNA	17 µl
10x Puffer	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl

4.1.2.4 Isolation großer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien

Sofern nachgewiesen werden konnte, dass das Plasmid das *insert* enthielt, wurde eine positive Bakteriensuspension dazu benutzt, um große Mengen des Plasmids herzustellen. Dazu wurden 400 ml Superbroth-Medium, das zuvor mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin) versehen worden war, in einen 2 l-Erlenmeyerkolben gegeben und mit 300 µl der ausgesuchten, positiven Bakteriensuspension angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert.

Am Tag darauf wurden von der gewachsenen Bakterienkultur 800 µl entnommen, mit 1 ml 32 % Glycin-haltigem Einfriermedium versetzt und bei -20°C eingefroren. Danach wurden die restlichen Bakterien für 10 min bei 4.600 x g pelletiert, der Überstand verworfen, das Bakterienpellet in 10 ml E1-Suspensionspuffer der Firma Genomed resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Lyse der Bakterien wurde das äquivalente Volumen E2-Lysepuffer zugegeben. Das im E2-Lysepuffer enthaltene SDS löst die Bakterienmembran auf, während das NaOH Proteine, chromosomale DNA und Plasmid-DNA denaturiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden 10 ml E3-Neutralisationspuffer zugegeben, und der Ansatz für 20 min bei 7.000 x g und 4°C abzentrifugiert, was dazu führte, dass die Plasmid-DNA von den Zellbestandteilen getrennt wurde. Vor dem Beladen der Maxi-Präparationssäule musste diese mit 20 ml E4-Equilibrierungspuffer equilibriert werden. Danach folgte die Beladung der Säule mit dem Überstand, in dem die Plasmid-DNA enthalten war. Nach dem Durchlauf des Überstands wurde die Säule dreimal mit je 20 ml E5-Waschpuffer gewaschen, und

anschließend die DNA mit 15 ml E6-Elutionspuffer von der Säule eluiert. Zum Fällern der DNA wurden 10,5 ml Isopropanol zum Eluat hinzugegeben, gemischt und die ausgefallene DNA durch erneute Zentrifugation für 20 min bei 7.000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet getrocknet und dann in 1 ml TE-Puffer aufgenommen. Zur Bestimmung der Ausbeute an Plasmid-DNA wurde die DNA-Konzentration im Photometer (Wellenlänge $\lambda=260$ nm) gemessen. Wie zuvor wurde auch in diesem Fall die Plasmid-DNA durch eine Restriktionsanalyse überprüft. Hierzu wurden fünf verschiedene Ansätze mit jeweils unterschiedlichen Restriktionsenzymen verwendet. Das sich dabei ergebende Restriktionsmuster wurde nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel überprüft. In bestimmten Fällen wurde die DNA zusätzlich durch eine Sequenzanalyse überprüft.

Puffer E4:

100 mM Natriumacetat (pH 5,0), 600 mM NaCl, 0,15 % Triton-X-100

Puffer E5:

100 mM Natriumacetat (pH 5,0), 800 mM NaCl

Puffer E6:

100 mM Natriumacetat (pH 5,0), 1500 mM NaCl

TE Puffer:

10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA

4.1.2.5 Sequenzanalyse

Die Analyse der jeweiligen doppelsträngigen DNA-Sequenz erfolgte mittels der *cycle-sequencing* Methode. Diese basiert auf der Didesoxymethode nach Sanger, welche auch als Kettenabbruchmethode bezeichnet wird (Sanger et al., 1977). Die Sequenzanalyse und deren Auswertung erfolgten durch die Firmen Sequiserve (Vaterstetten) und GATC Biotec (Konstanz).

4.1.3 Quantitative *RealTime*-PCR

4.1.3.1 RNA Isolation

Zur Bestimmung der relativen oder absoluten Menge einer spezifischen mRNA wurde eine quantitative *RealTime*-PCR durchgeführt. Für die Isolation der RNA aus den Zellen wurde der RNeasy Isolation Kit der Firma Qiagen verwendet. Dazu wurden 3×10^6 Zellen abgeerntet und mit 600 µl RLT-Lysepuffer, der mit 6 µl β -Mercaptoethanol versetzt worden war, lysiert. Das Lysat wurde mehrmals mit einer Spritze durch eine kleine Kanüle gezogen. Die dabei entstehenden Scherkräfte bewirkten ein Fragmentieren der genomischen DNA, damit diese anschließend leichter von RNA abgetrennt werden konnte. Anschließend wurden 700 µl Ethanol zugesetzt, das Gemisch auf eine Säule gegeben, und diese für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Dabei banden die Nukleinsäuren an die Säulenmatrix. Zellbestandteile, die nicht mit der Säulenmatrix interagierten und an diese banden, liefen ungehindert durch die Säule hindurch und wurden daher als Durchlaufraktion verworfen. Auf die Säule wurden dann 50 µl DNaseI gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Danach wurde die Säule zweimal mit je 600 µl RPE-Puffer gewaschen und wie zuvor jeweils für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Zum Trocknen der Säule wurde diese nach dem Waschen einmal wiederum für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Um die RNA von der Säule zu eluieren, wurden 25 µl DEPC-behandeltes H₂O auf die Säule gegeben, und diese für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

Zur Bestimmung der Ausbeute an Gesamt-RNA wurde die RNA-Konzentration im Photometer (Wellenlänge $\lambda = 230$ nm) bestimmt.

4.1.3.2 Reverse Transkription von mRNA zur Synthese von cDNA

Um mRNA in cDNA (*complementary DNA*) umzuschreiben, wurden 1 µg RNA mit 1 µl Oligo-dT-*primern* (Roche) versehen, und der Ansatz mit DEPC-behandeltem H₂O auf 18 µl aufgefüllt und für 5 min bei 70°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben vom Heizblock genommen und sofort für 2 - 3 min in Eiswasser gestellt.

Dabei banden die *primer* an die RNA, wodurch alle in der Probe befindlichen mRNAs später revers transkribiert werden konnten. Zu den abgekühlten Proben wurde dann der für die reverse Transkription nötige Enzym-Mix des SuperScript II Reverse Transcriptase Kits (Invitrogen) hinzugegeben, und die Proben für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren wurden die Proben anschließend nochmals für 15 min auf 70°C erhitzt.

Tabelle 4.5: Ansatz der reversen Transkription

RNA	1 µg
Oligo-dT-primer	1 µl
DEPC-H ₂ O ad	18 µl

5x First Strand Buffer	5 µl
dNTP (je 10 mmol)	1 µl
DTT (100 mM)	1 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl

4.1.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) ist eine sich wiederholende Reaktion, die es gestattet, einen bestimmten Sequenzabschnitt zu amplifizieren. Dabei werden sequenzspezifische Oligonukleotide (*primer*) verwendet, die den zu amplifizierenden Bereich eingrenzen. Zudem werden hitzestabile DNA-Polymerasen, wie z. B. die Taq-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* verwendet, die der hohen Temperatur zur Denaturierung der DNA widerstehen.

Bei der Auswahl der *primer* musste beachtet werden, dass deren Schmelztemperatur ähnlich war und mindestens 50°C betrug. Des Weiteren musste darauf geachtet werden, dass die beiden *primer* möglichst nur an den jeweiligen Sequenzabschnitt und nicht mit sich selbst oder miteinander hybridisierten.

Die Schmelztemperatur der *primer* wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_M = 4 \times \Sigma(G;C) + 2 \times \Sigma(A;T)$$

Tabelle 4.6: Standard PCR-Ansatz

5x PCR-Puffer	20 µl
<i>primer forward</i> (100 µM)	2 µl
<i>primer reverse</i> (100 µM)	2 µl
dNTP (je 10 mmol)	2 µl
DNA bzw. cDNA	1 µg
Taq-Polymerase (5 U/µl)	2 µl
ddH ₂ O ad	100 µl

Um ein Verdunsten des PCR-Ansatzes zu unterbinden, wurde der Ansatz mit ca. 50 µl Mineralöl überschichtet. Das jeweilige PCR-Programm richtete sich nach der Länge des Amplifikats (ca. 1 kb/min) sowie nach der Schmelztemperatur der verwendeten *primer*. Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurden 5 µl aus dem PCR-Ansatz entnommen, mit 5 µl DNA-Auftragspuffer versehen und in einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

4.1.3.4 Quantitative *RealTime*-PCR

Da die konventionelle PCR nur semi-quantitative Ergebnisse liefert, wurde für eine quantitative Analyse der mRNA-Transkriptmenge eine quantitative *RealTime*-PCR (*rtPCR*) durchgeführt. Dabei kommt es ebenfalls zu einer Amplifikation der eingesetzten DNA durch eine PCR-Reaktion, allerdings werden die Ergebnisse der Amplifikation in Echtzeit aufgezeichnet, was die Bezeichnung *RealTime*-PCR erklärt. Der Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR-Green* macht es möglich, die amplifizierte DNA während der gesamten Reaktion zu detektieren. *SYBR-Green* bindet nicht sequenzspezifisch in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix und kann mit Licht (Wellenlänge $\lambda = 530$ nm) angeregt werden. Das vom Farbstoff emittierte Licht wird am Ende eines jeden PCR-Zyklus detektiert und repräsentiert somit die absolute Menge erhaltener DNA, die mit jedem weiteren PCR-Zyklus zunimmt.

Die Quantifizierung der Menge an DNA einer Probe erfolgt als absolute Quantifizierung. Um die Proben untereinander vergleichen zu können, muss eine relative Quantifizierung durchgeführt werden, wobei die Menge an DNA einer bestimmten Probe im Verhältnis zur entsprechenden Standardprobe steht.

Der Idealfall tritt ein, wenn pro Zyklus eine Verdopplung stattfindet ($E = 2$). E gibt die Amplifikationseffizienz an, welche sich für jede PCR und jedes Gen unterscheidet. Sie ist beispielsweise abhängig von Faktoren wie der Sequenz, der Länge des PCR-Produktes oder auch der Reinheit der Nukleinsäuren. Um diese Effizienz ermitteln zu können, wurde für jedes amplifizierte Gen einer jeden PCR eine Standardkurve erstellt. Zudem wurde in direktem Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Amplifikat intakt war. Dies ist möglich, da doppelsträngige DNA abhängig von deren Sequenz, GC-Gehalt und Länge einen spezifischen Schmelzpunkt aufweist.

Zur Durchführung einer quantitativen *RealTime*-PCR wurde 1 μl der zuvor synthetisierten cDNA als *template* zusammen mit 0,5 μM der entsprechenden *primer* zu einem Ansatz bestehend aus dem LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) gegeben. Der gesamte 20 μl Ansatz wurde anschließend in spezielle Glaskapillaren (LightCycler Capillaries 20 μl , Roche) überführt, und diese für die PCR und Analyse am LightCycler 2.0 (Roche) verwendet. Als Kontrolle für etwaige Verunreinigungen wurde für jedes *primer*-Paar ein Ansatz mitgeführt, der statt der DNA Wasser enthielt. Wie zuvor beschrieben, musste für jede Probe eine entsprechende Standardkontrolle mitgeführt werden, um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen.

Tabelle 4.7: PCR-Ansatz für die quantitative *rt*PCR

H ₂ O	14,8 μl
MgCl ₂ (25mM)	1,2 μl
<i>primer forward</i> (100 μM)	0,5 μl
<i>primer reverse</i> (100 μM)	0,5 μl
dNTP (je 10 mmol)	1 μl
LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I	2 μl

4.1.4 Herstellung von in vitro transkribierter RNA

Für die Synthese von in vitro transkribierter RNA (ivtRNA) wurden spezielle Plasmide verwendet, die den Promotor des T7 Phagen tragen. Diese Plasmide kodierten zudem für das entsprechende Gen, gefolgt von einer 116 Basen langen Abfolge von Adeninen. Das Plasmid wurde zunächst mit einem direkt nach dem Poly-A-Bereich schneidenden Restriktionsenzym linearisiert, und die DNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Nach der Messung der DNA-Konzentration wurde 1 µg der linearisierten Plasmid-DNA direkt in die Reaktion eingesetzt. Für den gesamten Reaktionsansatz wurde der mMessage mMachine-Kit (Ambion) verwendet. Der gesamte Ansatz von 20 µl wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde 1 µl des im Kit enthaltenen Enzyms Turbo-DNase zugegeben und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Um die transkribierte RNA in möglichst hoher Konzentration zu erhalten, wurde diese nach der Inkubation durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-Zugabe gefällt, in 50 µl DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen und die RNA-Konzentration photometrisch gemessen.

Tabelle 4.8: Reaktionsansatz für die Herstellung in vitro transkribierter RNA

2x NTP/CAP	10,0 µl
10x Puffer	2,0 µl
Enzym-Mix	2,0 µl
DNA	1 µg
ddH ₂ O ad	20 µl

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Herstellung von RIPA-Extrakten

Für die Herstellung von Zellextrakten wurden die Zellen für 5 min bei 500 x g zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Um restliches Medium zu entfernen, wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und erneut für 5 min bei 500 x g pelletiert. Der Überstand wurde wiederum vorsichtig abgenommen und die Zellen in 50 µl RIPA-Puffer resuspendiert, dem unmittelbar vor Verwendung 2 µl eines Proteaseinhibitor-*Cocktails* (Roche) zugesetzt worden waren. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und danach für 15 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Proteine wurden im Überstand geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

RIPA-Puffer:

1 % NP40; 0,5% DOC (Deoxycholat); 0,15 M NaCl; 5 mM EDTA; 50 mM Tris pH 8.0; 0,1 % SDS in H₂O

4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer molekularen Masse. Dazu wurden die Extrakte zunächst mit einem Drittel Volumen an SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt, die Proteine durch Erhitzen für 5 min bei 95° denaturiert und anschließend auf das Polyacrylamidgel (PAA-Gel) geladen. Im Ladepuffer war SDS enthalten, das an die Proteine bindet und ihnen eine negative Ladung verleiht. Die Denaturierung der Proteine hat den Vorteil, dass deren Sekundär- und Tertiärstrukturen nicht das Laufverhalten beeinflussen. Die hierbei verwendeten Polyacrylamidgele setzten sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen. Im Sammelgel kommt es zur Fokussierung der Proteine und im 10,5 %igen Trenngel zu deren elektrophoretischer Auftrennung. Nach dem Beladen des Gels erfolgte die elektrophoretische Auftrennung für 1 - 2 h bei 20 mA (Laemmli 1970).

Sammelgel:

2 ml 30 % PAA; 7,5 ml 2 x Tris/SDS pH 6.8; 5,4 ml H₂O; 90 µl 10 % APS; 10 µl TEMED
2 x Tris/SDS pH 6.8: 7,56 g Tris-Base; 2,5 ml 20 % SDS pH 6.8; H₂O ad 250 ml

Trenngel (10,5 %):

7 ml 30 %PAA; 10 ml 2 x Tris/SDS pH 8.8; 2,8 ml H₂O; 167 µl 10 % APS; 17 µl TEMED
2 x Tris/SDS pH 8.8: 22,68 g Tris-Base; 2,5 ml 20 % SDS; pH 8.8; H₂O ad 250 ml

Elektrophoresepuffer:

0,025 M Tris-Base; 0,2 M Glycin; 0,1 % SDS in H₂O

SDS-PAGE-Ladepuffer:

200 mM Tris/HCl pH 6.8; 8 % SDS; 40 % Glycerin; 400 mM DTT; 0,2 mM EDTA/NaOH
pH 8.0; 0,04 % Bromphenolblau

4.2.3 Western-Transfer

Zur Detektion der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden diese aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Hybond-P; GE Healthcare) übertragen. Das Gel wurde dazu in eine Transferkammer gelegt, und die Membran darauf platziert. Die Transferkammer wurde danach in einen Transfertank gestellt und dieser mit Transferpuffer befüllt. Durch das Anlegen einer Spannung von 120 Volt für ca. 1 Stunde wurden die Proteine auf Grund ihrer negativen Ladung zum Pluspol gezogen. Durch die entsprechende Ausrichtung von Gel und Membran wanderten die Proteine aus dem PAA-Gel auf die PVDF-Membran (Gershoni und Palade, 1982).

Transferpuffer:

14 g Glycin; 4,5 g Tris; 300 ml Methanol; ad 1,5 l H₂O

4.2.4 Immundetektion der transferierten Proteine

Nach der Proteinübertragung auf die Membran wurde diese für 1 Stunde in Blockpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Primärantikörper-Lösung gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Falcon-Roller inkubiert. Um ungebundene Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran am Tag darauf dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Membran unter ständigem Schütteln für 1 Stunde in einer

Sekundärantikörper-Lösung inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurde die Membran für 5 min in ECL-Plus-Detektionslösung (GE Healthcare) inkubiert. Da der Sekundärantikörper mit dem Enzym HRP (*horseradish-peroxidase*) gekoppelt war, konnte das zugegebene Substrat metabolisiert werden, was zu einer Lumineszenz-Emission führte. Diese Reaktion und somit die auf der Membran gebundenen Proteine konnten durch Auflegen eines Röntgenfilms und anschließender Autoradiographie nachgewiesen werden.

Blockpuffer:

5 % Magermilchpulver in PBS

Waschpuffer:

3 % Magermilchpulver in PBS

Primärantikörper-Lösung:

Primärantikörper in 3 % Magermilchpulver in PBS

Sekundärantikörper-Lösung:

Sekundärantikörper in 3 % Magermilchpulver in PBS

4.2.5 Quantifizierung der Proteinmenge

Um eine Quantifizierung der im Gel aufgetrennten Proteinmengen durchzuführen, wurden die Proteine, wie unter 4.2.4 beschrieben, auf eine Membran übertragen. Allerdings wurde hierbei eine Hybond-C-Nitrozellulosemembran verwendet. Nach dem Transfer wurde die Membran ebenfalls für 1 Stunde in Blockpuffer und über Nacht in Primärantikörper-Lösung inkubiert. Danach wurde die Membran wiederum dreimal mit Waschpuffer gewaschen und für 1 Stunde in IRDye800CW-gekoppelter Esel-anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper-Lösung inkubiert. Der ungebundene Sekundärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T-Waschpuffer entfernt, bevor die Proteinmengen mit Hilfe des Odyssey-Infrarot-Geräts (Li-COR) quantitativ bestimmt wurden.

Blockpuffer:

5 % Magermilchpulver in PBS

Waschpuffer:

3 % Magermilchpulver in PBS

TBS-T Waschpuffer:

0,05 % Tween20 in TBS

Primärantikörper-Lösung:

Primärantikörper in 3 % Magermilchpulver in PBS

Sekundärantikörper-Lösung:

Sekundärantikörper in 3 % Magermilchpulver in PBS

4.2.6 Coomassie-Färbung

Um Proteine direkt im Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, wurden Zellextrakte, wie unter 4.2.2 und 4.2.3 beschrieben, hergestellt und diese in einem PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 10 min in H₂O gewaschen und über Nacht in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Färbelösung abgenommen, und das gefärbte Gel in H₂O geschwenkt, bis dieses so weit entfärbt war, dass die Banden deutlich sichtbar waren.

4.2.7 Massenspektrometrie

Für eine Analyse von Proteinen mittels massenspektrometrischer Verfahren, wurden HEK293T-Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert und für 48 h kultiviert. 6 h bevor die Zellen geerntet wurden, wurde der Proteasom-Inhibitor MG132 (10 µM) zugesetzt, um mögliche Ubiquitin-Modifikationen zu stabilisieren. Anschließend wurden die Zellen geerntet und für 5 min bei 500 x g pelletiert. Um die Zellen zu lysieren, wurden diese in Harnstoff-Lysepuffer aufgenommen, der ebenfalls mit MG132 (10 µM) versetzt worden war. Um die Zellfragmente von den Proteinen zu trennen, wurden die lysierten Zellen für 15 min bei 5.000 x g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Da die Proteine C-terminal mit einem Histidin₆ (His₆) -Etikett fusioniert waren, war es möglich die Proteine mit Hilfe von Nickel-NTA-*beads* zu isolieren, da die Ni-NTA-*beads* mit hoher Affinität von dem His₆-Etikett gebunden werden. Aus diesem Grund wurden zum Überstand 300 µl Nickel-NTA-*beads* zugegeben und die Proteine über Nacht bei 4°C auf dem Falcon-Roller inkubiert. Am folgenden Tag wurden die an den Ni-NTA-*beads* gebundenen Proteine durch Zentrifugation, für 10 min bei 4.500 x g, vom Überstand getrennt, in 300 µl SDS-Ladepuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C aufgekocht.

Beim Erhitzen der Proteine lösen sich diese von den Ni-NTA-*beads* ab. Anschließend wurden die Proteine mit den enthaltenen Ni-NTA-*beads* auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Anlegen der Spannung kam es zum Einlaufen der Proteine ins Gel, während die Ni-NTA-*beads* in den Taschen des Gels zurückblieben. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Proteine im Gel mit Coomassie-Färbelösung angefärbt, die Banden entsprechender Größe ausgeschnitten und in H₂O aufgenommen. Die massenspektrometrische Analyse wurde mit Hilfe eines LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometers durchgeführt und die Daten mit der Software Scaffold ausgewertet.

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Um die Anzahl an lebenden Zellen in einer Kultur zu bestimmen, wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und mit 10 µl Trypanblau-Lösung vermischt. 10 µl dieser Mischung wurden in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und unter dem Lichtmikroskop die Anzahl der Zellen bestimmt. Die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgte durch eine Blaufärbung der toten Zellen, da das Trypanblau durch die beschädigte Zellmembran toter Zellen eindringen konnte und diese blau anfärbte. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus vier Großquadraten, die jeweils wiederum in 16 kleine Quadrate unterteilt sind. Ausgezählt wurden dabei alle vier Großquadrate, und daraus der Mittelwert errechnet.

Berechnung der Gesamtzellzahl:

Mittelwert pro Großquadrat x 2 (da Verdünnung 1:1 mit Trypanblau) x 10⁴
(Volumen der Zählkammer) x Volumen der gesamten Zellsuspension

4.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden 1×10^7 Zellen verwendet, die zuvor für 5 min bei 460 x g abzentrifugiert worden waren. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Das im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert die Bildung von Eiskristallen, die die Zellmembran schädigen. Das Einfrieren von Zellen sollte langsam erfolgen. Aus diesem Grund wurden die Kryoröhrchen mit mehreren Lagen Zellstoff umwickelt und bei -80°C gelagert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Kryoröhrchen zur dauerhaften Lagerung in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

Das Auftauen von gefrorenen Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C , wobei die Zellen sofort nach ihrem Auftauen im jeweiligen Kulturmedium aufgenommen wurden. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert, erneut in Medium aufgenommen und in Kulturflaschen ausgebracht.

Einfriermedium:

Dimethylsulfoxid 10 %; FCS 90 %

4.3.3 Kultivierung humaner Zellen

Adhärent wachsende Zelllinien

Die Kultivierung der verwendeten humanen, embryonalen Nierenzelllinie HEK293T erfolgte in Kulturschalen in DMEM-Komplettmedium. Durch Trypsin-Behandlung wurden die Zellen vom Boden der Kulturschale abgelöst, in ein Spitzbodenröhrchen überführt und anschließend für 5 min bei 460 x g sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in DMEM-Komplettmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:10 erneut in einer Kulturschale ausgebracht.

Suspensionszelllinien

Die Zelllinien LCL1.11, LCL-MSK und DG75 sind Suspensionszelllinien, die in RPMI1640-Komplettmedium kultiviert wurden. Je nach Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen alle vier Tage durch Mediumwechsel im Verhältnis 1:2 bis 1:10 verdünnt.

4.3.4 Kultivierung von etablierten T-Zelllinien

Die verwendeten T-Zelllinien wurden in T-Zell-Medium mit 10 U/ml IL-2 und 10 µg/ml Ciprofloxacin in 24-Lochplatten kultiviert. Die T-Zellen wurden im 14-Tages-Zyklus stimuliert. Zur Stimulation der T-Zellen wurden bestrahlte (80 Gray), autologe LCL als antigenpräsentierende Zellen verwendet, die 2 h vor Bestrahlung mit dem jeweiligen Peptid (2 µg/ml) beladen worden waren. Nach Bestrahlung wurden die Zellen mindestens dreimal mit RPMI1640-Medium gewaschen, um ungebundene Peptide zu entfernen und eine Verschleppung des Peptids zu unterbinden. Für die Stimulation wurden pro Loch einer 24-Lochplatte 1×10^6 T-Zellen zusammen mit 5×10^5 peptidbeladenen und bestrahlten LCL ausgebracht. Am Tag nach der Stimulation sowie alle drei Tage wurden pro Loch 10 U/ml IL-2 zugesetzt.

T-Zellstimulationsmedium:

T-Zellmedium; 10 U/ml IL-2; 10 µg/ml Ciprofloxacin

4.3.5 Transfektion von adhärenenten Zellen mit Polyethylenimin

Die Transfektion von HEK293T-Zellen erfolgte bei einer 70 - 80 %igen Konfluenz der Zellen. Zur Herstellung des Transfektionsmix wurde OPTIMEM (Invitrogen) mit der zu transfizierenden Plasmid-DNA versetzt und anschließend Polyethylenimin (PEI) zugegeben. Das Gemisch wurde für 15 min bei RT inkubiert und danach im entsprechenden Volumen DMEM-Komplettmedium aufgenommen. Nach Entfernung des Kulturmediums wurde der Transfektionsmix vorsichtig, ohne die Zellen vom Boden der Kulturschale abzuspülen, auf die Zellen pipettiert. 8 h nach der Transfektion wurde der Transfektionsmix von den Zellen entfernt und durch DMEM-Komplettmedium ersetzt.

Tabelle 4.9: Transfektions-Mix (Volumenangabe pro Loch einer 6-Loch Platte)

OPTIMEM (Invitrogen)	250 µl
Plasmid-DNA	7,5 µg
PEI (1 mg/ml in H ₂ O pH 7.0)	11,25 µl
DMEM-Komplettmedium	5 ml

4.3.6 Transfektion von Suspensionszellen mittels Elektroporation

Da die höchsten Transfektionsraten mit Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase erzielt wurden, wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion 1:1 gesplittet. Pro Transfektion wurden 1×10^7 Zellen verwendet. Diese wurden für 5 min bei 460 x g pelletiert, der Überstand verworfen, mit 10 ml RPMI1640-Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml OPTIMEM (Invitrogen) resuspendiert und nochmals für 5 min bei 460 x g sedimentiert. Nachfolgend wurden die Zellen in 300 µl OPTIMEM aufgenommen, und die Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,4 cm) überführt. Dazu wurden 20 µg der entsprechenden Plasmid-DNA hinzu pipettiert und die Zellen mit 230 Volt und 975 µF elektroporiert. Nach dem Elektroschock wurden die Zellen unmittelbar in 1 ml FCS aufgenommen und in 10 ml RPMI1640-Komplettmedium überführt (Baum et al., 1994).

Zur Transfektion von ivtRNA wurden ebenfalls 1×10^7 Zellen verwendet, die entsprechend der obigen Beschreibung vorbereitet wurden. Zur Transfektion wurden diese allerdings in 200 µl OPTIMEM aufgenommen, in eine Elektroporationsküvette überführt und mit 10 µg RNA versehen. Die Zellen wurden dann bei 300 Volt und 150 µF elektroporiert (Bürdek et al., 2010).

4.3.7 Auswaschen von Peptiden aus MHC-Klasse-I-Molekülen

Um bereits auf der Zelloberfläche präsentierte Peptide aus MHC-Klasse-I-Molekülen auszuwaschen, wurden die Zellen abgeerntet und für 5 min bei 460 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen im äquivalenten Volumen Strip-Puffer aufgenommen, sofort auf Eis gestellt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit RPMI1640-Medium gewaschen, um jegliche Reste des sauren Puffers zu entfernen. Danach wurden die Zellen wieder in RPMI1640-Komplettmedium aufgenommen.

Strip-Puffer:

0,131 M Zitronensäure; 0,066 M NaH_2PO_4 ; pH 3,1

4.3.8 Magnetische Zellseparation

Mittels magnetischer Zellseparation (*magnetic cell separation*; MACS) können Populationen aus einem heterogenen Zellgemisch isoliert und somit angereichert werden. Durch die Expression des Rezeptors für Nervenwachstumsfaktoren (NGFR) auf der Zelloberfläche unterschieden sich transfizierte von nicht-transfizierten Zellen. Durch Verwendung eines anti-NGFR-Primärantikörpers sowie eines spezifischen Sekundärantikörpers, der mit Eisenpartikeln gekoppelt war, war es möglich, die beiden Zellpopulationen magnetisch voneinander zu trennen.

Dazu wurden die Zellen 48 h nach Transfektion abgeerntet und durch Zentrifugation für 5 min bei 460 x g pelletiert. Zum Waschen der Zellen wurden diese zweimal in 30 ml RPMI1640 resuspendiert und zentrifugiert. Nachfolgend wurden sie in 500 µl RPMI1640 aufgenommen, 100 µl des anti-NGFR-Primärantikörpers zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zu der Zellsuspension 10 ml MACS-Puffer zugesetzt und die Zellen für 5 min bei 460 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 160 µl MACS-Puffer resuspendiert, mit 40 µl Ziege-anti-Maus IgG MicroBeads (Miltenyi) versetzt und nochmals für 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden, wie zuvor, 10 ml MACS-Puffer zugegeben, und die Zellen abzentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und auf die zuvor mit 4 ml MACS-Puffer equilibrierte, im MACS-Ständer befindliche Säule geladen. Nachdem die Zellsuspension durch die Säule gelaufen war, wurde diese durch Zugabe von jeweils 3 ml MACS-Puffer dreimal gewaschen. Der Durchlauf wurde dabei als Negativfraktion aufgefangen. Zur Elution der in der Säule gebundenen Positivfraktion wurde die Säule aus dem MACS-Ständer entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und zweimal mit je 5 ml MACS-Puffer eluiert, wobei die zweiten 5 ml mit einem zu den Säulen passenden Pistill durchgedrückt wurden. Sowohl die Positiv- als auch die Negativfraktion wurde anschließend für 5 min bei 460 x g abzentrifugiert und einmal mit RPMI1640-Medium gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 460 x g wurden die Zellen in RPMI1640-Komplettmedium aufgenommen und entsprechend der Ausbeute entweder in einem Loch einer 24-Loch-Platte oder in einer kleinen Zellkulturflasche ausgebracht.

MACS-Puffer:

0,5 % BSA; 2 mM EDTA in PBS; sterilfiltriert

4.3.9 Durchflusszytometrie

Die Untersuchung und Analyse von bestimmten Merkmalen oder Oberflächenmolekülen von Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie durch die Messung der Fluoreszenzintensität in einem FACS-Gerät (FACS Calibur; Becton-Dickinson). Für diese Untersuchungen war es erforderlich, die Oberflächenstrukturen mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper anzufärben. Eine Analyse der GFP-Expression von Zellen hingegen konnte ohne Antikörperfärbung durchgeführt werden.

Zur Färbung wurden üblicherweise $1 - 2 \times 10^5$ Zellen verwendet. Diese wurden für 5 min bei $460 \times g$ zentrifugiert und in FACS-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 100 μ l Antikörper-Lösung (1:50 in FACS-Puffer) aufgenommen und für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde der ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen entfernt und die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen, welcher mit Propidiumjodid (Endkonzentration 1 μ g/ml) versetzt war. Propidiumjodid ermöglicht eine Detektion von toten Zellen, da es durch die poröse Zellmembran apoptotischer Zellen ins Zellinnere dringen und in die DNA interkalieren kann. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der FlowJo-Software.

FACS-Puffer:

2 % FCS in PBS; 0,05 % NaN_3

4.3.10 Enzyme-linked immunosorbant assay

Mittels eines ELISA-Tests (*enzyme-linked immunosorbant assay*) wurde die Konzentration an sezernierten Zytokinen als Maß für die Antigenerkennung durch T-Zellen bestimmt. Zu diesem Zweck wurden antigenpräsentierende Zellen mit antigenspezifischen T-Zellen für 16 h kokultiviert, und anschließend die Konzentration an freigesetzten IFN- γ oder GM-CSF im Überstand ermittelt. Dazu wurden 96-Loch ELISA-Platten (Corning) verwendet. Jedes Loch wurde mit 100 μ l *Capture*-Antikörper (1:180 in PBS) befüllt und über Nacht bei RT inkubiert. Die Platten wurden am nächsten Tag dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und anschließend pro Loch 300 μ l Blockpuffer zugegeben. Die Platten wurden für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Platten wurden pro Loch 100 μ l des jeweiligen Zellkulturüberstandes zugegeben und für weitere 2 h inkubiert. Der

Zellkulturüberstand wurde nach der Inkubation durch drei weitere Waschschritte entfernt und 100 µl/Loch *Detection*-Antikörper zugeben und erneut für 2 h bei RT inkubiert. Darauf folgte wieder ein dreimaliges Waschen der Platten. Danach wurden 100 µl/Loch des Streptavidin-HRP-Antikörpers (1:200 in *Reagent Diluent*) zuzugeben und für 20 min inkubiert. Zuletzt wurde die Platte erneut dreimal gewaschen, um abschließend 100 µl/Loch einer Färbelösung zuzugeben. Die Färbereaktion wurde nach ca. 5 min, abhängig von der Blaufärbung des Substrates, durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung beendet. Die Färbung wurde dann umgehend bei 450 nm am ELISA-reader (Tecan) gemessen.

ELISA-Blockpuffer:

PBS; 1 % BSA; 5 % Sucrose; 0,05 % NaN₃

ELISA-Waschpuffer:

PBS; 0,05 % Tween-20

Reagent Diluent:

PBS; 1 % BSA; sterilfiltriert

Färbelösung:

BD OptEIA Substrat Reagenz A und B (Mischverhältnis 1:1)

Stopplösung:

2N H₂SO₄

4.3.11 Fluoreszenzmikroskopie

Um die subzelluläre Lokalisation von Proteinen zu untersuchen, wurden HEK-293T-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für Fusionsproteine kodierten, bestehend aus dem Zielprotein und entweder dem grün fluoreszierenden Protein GFP, oder des rot fluoreszierenden Proteins dsRED. Zu diesem Zweck wurden Deckgläser in 6-Lochplatten gelegt, und die Zellen darauf ausgebracht. Sobald eine Konfluenz der Zellen von ca. 70 - 80 % erreicht war, wurden diese mittels Polyethylenimin transfiziert. 24 h später wurden die Deckgläschen mit den transfizierten Zellen entnommen und auf Objektträger gelegt. Zum Einbetten der Zellen wurde DAPI-haltiges Vectashield-Einbettmedium (Vector Laboratories Inc.) verwendet. Um die Präparate zu konservieren, wurde durch Verwendung von Klarlack das Deckglas auf dem Objektträger fixiert. Sowohl die Detektion als auch die Aufnahmen der Fluoreszenzsignale wurden mit einem OMX V2-Mikroskop durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1 Die Rolle maturer Proteine bei der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation

5.1.1 Expression von Modellantigenen mit modulierbarer Destabilisierungsdomäne

Um eine gezielte Modulation der Stabilität von Modellantigenen zu ermöglichen, wurde das von der Firma Clontech vertriebene ProteoTuner System verwendet. Dieses besteht aus zwei Komponenten, dem Plasmid pPTuner und dem Reagenz Shield1. Das pPTuner Plasmid kodiert für eine Destabilisierungsdomäne (Malnati et al., 1992), welche auf dem Protein FKBP12 basiert. Eine eingeführte Mutation, welche die Aminosäuresubstitution L106P zur Folge hat, führt zum raschen proteasomalen Abbau des Proteins. Durch Fusion dieser Domäne an ein Zielprotein wird die Instabilität auf das komplette Fusionsprotein übertragen, wodurch dieses über das Proteasom abgebaut wird. Die Substanz Shield1, die zweite Komponente des ProteoTuner Systems, bindet an die Destabilisierungsdomäne und bewirkt eine Stabilisierung und einen Schutz vor proteasomaler Degradation. Shield1 ist membrangängig und kann direkt zum Zellkulturmedium zugegeben und bei Bedarf durch Waschen der Zellen wieder entfernt werden (Banaszynski et al., 2006; Banaszynski et al., 2008) (Abb. 5.1 A).

Für eine Untersuchung der Rolle maturer Proteine in der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation wurden die EBV-Proteine BRLF1, EBNA1 sowie die Deletionsmutante EBNA1 Δ GA verwendet. Die Mutante EBNA1 Δ GA basiert auf der Deletion einer zentral liegenden, repetitiven Sequenz bestehend aus einer Abfolge von Glycinen und Alaninen (GA). Da dieser repetitive Bereich die Proteinstabilität und die Translationseffizienz beeinflusst (Daskalogianni et al., 2008; Levitskaya et al., 1995; Levitskaya et al., 1997; Yin et al., 2003), wurde diese Mutante als mögliche instabilere Variante von EBNA1 verwendet. Um geeignete Modellantigene, die sich in ihrer Stabilität modulieren lassen, zu identifizieren, wurden die offenen Leserahmen (*open reading frame*; ORF) der drei Kandidatengene an die Destabilisierungsdomäne fusioniert.

Des Weiteren wurde das für GFP kodierende Gen, entweder direkt oder getrennt durch eine IRES-Sequenz an die Kandidatenantigene angefügt. Somit entstanden Expressionskonstrukte für DD-Antigen-GFP und DD-Antigen-IRES-GFP.

Die Fusionsgene wurden in den pRTS1-Vektor unter die Kontrolle eines Tetrazyklin-regulierbaren Promotors (Tet-Promotor) kloniert, was eine gezielte An- und Abschaltung der Genexpression erlaubt (Bornkamm et al., 2005). Ebenfalls unter die Kontrolle des bidirektionalen, Tetrazyklin-regulierbaren Promotors wurde eine biologisch inaktive, trunkierte Form des Nervenwachstumsfaktorrezeptors (*nerve growth factor receptor*; *NGFR*) eingebracht, was eine Anreicherung der transfizierten Zellen mittels magnetischer Zellseparation mit Hilfe eines NGFR-spezifischen Antikörpers ermöglichte. Da der pRTS1-Vektor zudem den plasmidalen Replikationsursprung oriP des Epstein-Barr-Virus trägt, replizieren die Plasmide episomal in den transfizierten Zellen (Abb. 5.1 B).

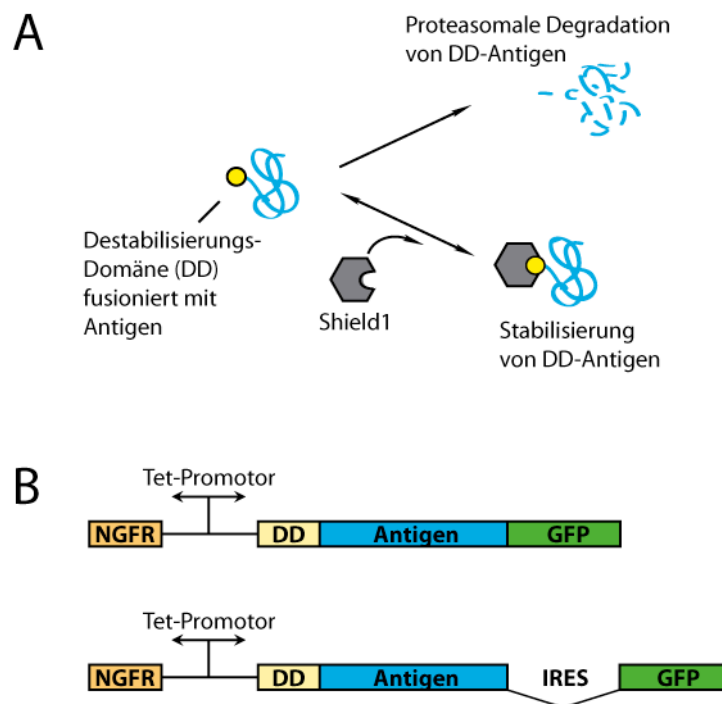


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des ProteoTuner Systems und der verwendeten Expressionskonstrukte

(A) Die Destabilisierungsdomäne (DD) überträgt, nach deren Fusion an ein Zielprotein, ihre Instabilität auf das gesamte Fusionsprotein, wodurch dieses rasch durch das Proteasom abgebaut wird. Die zellmembrangängige Substanz Shield1 bindet an die

Destabilisierungsdomäne, bewirkt ihre Stabilisierung und bewahrt das Fusionsprotein vor proteasomaler Degradation (verändert nach Clontech Laboratories, Inc.). **(B)** Das aus Destabilisierungsdomäne, Antigen und GFP bestehende Fusionskonstrukt stand ebenso wie eine trunkierte Variante des Nervenwachstumsfaktorrezeptors (NGFR) unter der Kontrolle eines bidirektionalen Tetrazyklin-regulierbaren Promotors (Tet-Promotor). Durch Zugabe des Tetrazyklin-Derivats Doxyzyklin konnte die Genexpression angeschaltet und bei Bedarf durch Waschen der Zellen wieder abgeschaltet werden.

5.1.2 Modulation der Proteinstabilität mit Hilfe von Shield1

Um zu untersuchen, ob bzw. welche der verwendeten EBV-Proteine sich durch das ProteoTuner System in ihrer Stabilität beeinflussen lassen, wurden die Proteinstabilitäten sowohl in unbehandelten, wie auch in Shield1-behandelten Zellen, mittels FACS und Western-Blot untersucht. Hierzu wurden die stabil transfizierten Zelllinien LCL1.11-BR [DD-BRLF1-GFP], LCL-MSC-E1 [DD-EBNA1-GFP] und LCL-MSC-E1ΔGA [DD-EBNA1ΔGA-GFP] verwendet, wobei die Zelllinie LCL1.11 mit dem DD-BRLF1-GFP-Plasmid und die Zelllinie LCL-MSC entweder mit dem DD-EBNA1-GFP-, oder mit dem DD-EBNA1ΔGA-GFP-Plasmid stabil transfiziert worden war.

Um die Genexpression zu induzieren, wurden die Zellen mit 1 µg/ml Doxyzyklin und 0,5 µM Shield1 behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen in zwei Fraktionen aufgeteilt und mit bzw. ohne Shield1 weiterkultiviert. Die Zellen wurden 4 bzw. 24 h später geerntet, und die Proteinmengen mittels Durchflusszytometrie und Western-Blot untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse beinhaltete sowohl die Messung der Anzahl GFP-positiver Zellen als auch die Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*; MFI). In den EBNA1ΔGA- und BRLF1-Transfektanten war sowohl der Prozentsatz an GFP-positiven Zellen als auch die Fluoreszenzintensität in unbehandelten Zellen im Vergleich zu Shield1-behandelten Zellen nach 4 und 24 h deutlich vermindert. Im Fall von Wildtyp-EBNA1 konnten hingegen keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 5.2 A - C).

Zusätzlich wurden Zellextrakte hergestellt und die Menge an BRLF1- und EBNA1-Protein im Western-Blot durch Verwendung eines BRLF1- beziehungsweise EBNA1-spezifischen Antikörpers ermittelt. Ein GAPDH-spezifischer Antikörper wurde zur Kontrolle der geladenen Lysatmengen, beziehungsweise zur Normalisierung der gemessenen Proteinmengen

verwendet. Die Detektion erfolgte zum einen mit Hilfe eines Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpers, dessen emittiertes Fluoreszenzsignal am Odyssey Infrared Imager (Li-COR) gemessen wurde. Zum anderen wurden die Proteinmengen mittels eines konventionellen Western-Blots analysiert. In allen drei experimentellen Ansätzen konnte eine deutliche Modulierbarkeit der Stabilität der BRLF1- und EBNA1 Δ GGA-Fusionproteine nachgewiesen werden. Wildtyp-EBNA1 hingegen wurde durch die Fusion an DD nicht destabilisiert. Auf Grund dessen wurden BRLF1 und EBNA1 Δ GGA als potentielle Kandidaten-Antigene ausgewählt (Abb. 5.2 D).

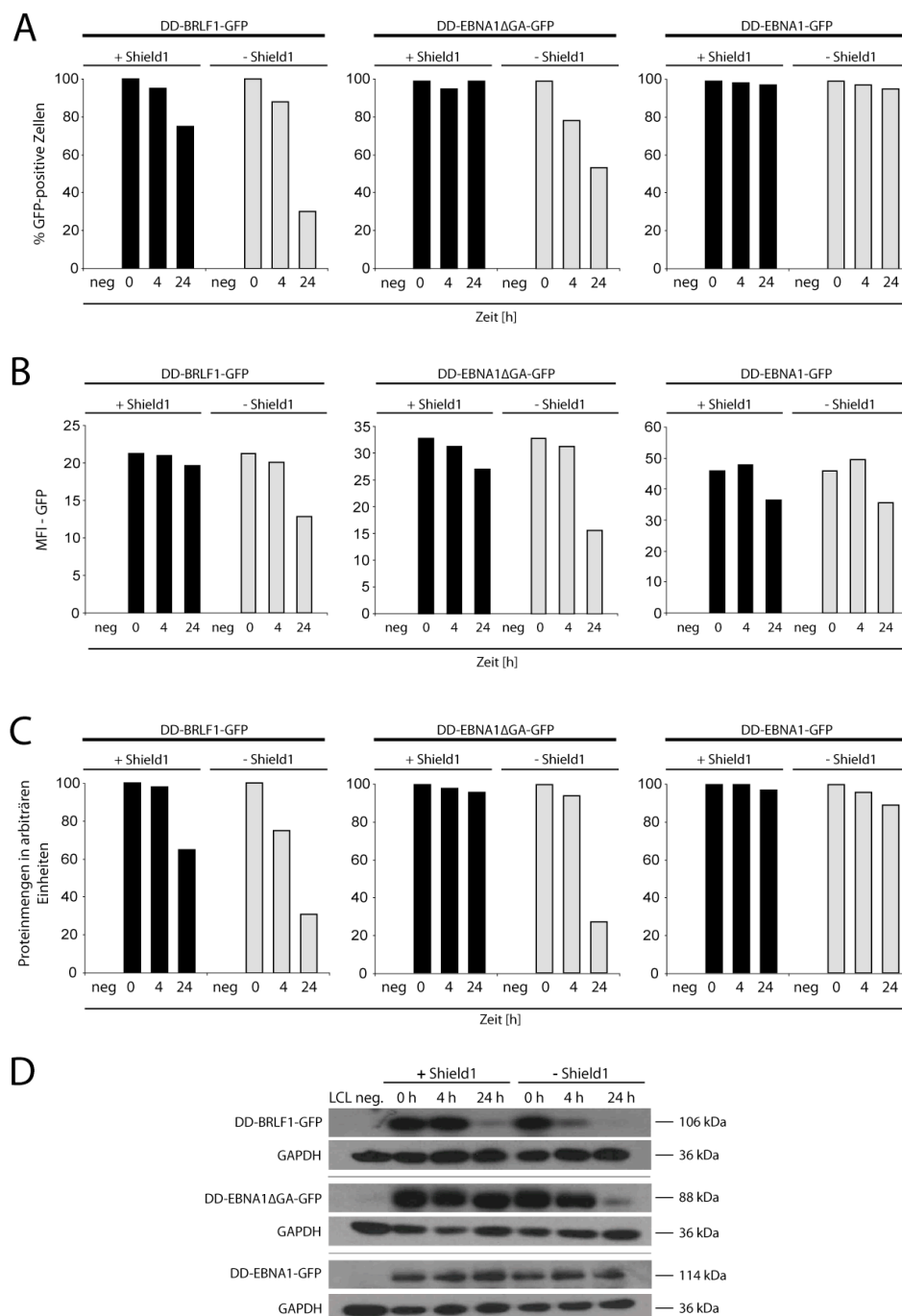


Abbildung 5.2: Untersuchung der Proteinstabilität der Fusionsproteine

Die mit den DD-BRLF1-GFP-, DD-EBNA1-GFP-, oder DD-EBNA1 Δ GA-GFP-Expressionsplasmiden stabil transfizierten Zelllinien wurden gleichzeitig mit 1 μ g/ml Doxyzyklin und 0,5 μ M Shield1 für 24 h behandelt. Anschließend wurden die Substanzen ausgewaschen, die Zellen in zwei Fraktionen unterteilt und in An- bzw. Abwesenheit von 0,5 μ M Shield1 weiterkultiviert. Nach 0, 4 und 24 h wurden die Zellen geerntet und analysiert. **(A)** FACS-Analyse des prozentualen Anteils GFP-positiver Zellen in Relation zum Zeitpunkt 0 h (0 h = 100 %). **(B)** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der transfizierten Zellen. **(C)** Zur Quantifizierung der Proteinmengen wurden Zelllysate hergestellt, und diese in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Verwendung von BRLF1-, EBNA1- und GAPDH-spezifischen Primärantikörpern sowie Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern. Das Fluoreszenzsignal wurde am Odyssey Infrared Imager (Li-COR) quantifiziert. Die Proteinmengen wurden auf die jeweilige GAPDH-Ladekontrolle normalisiert. **(D)** Die Proteinmengen und -größen wurden zudem anhand eines konventionellen Western-Blots analysiert. Hier erfolgte die Detektion der Proteine durch Verwendung von anti-BRLF1-, anti-EBNA1- bzw. anti-GAPDH-Antikörpern und HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern. Repräsentativ dargestellt ist jeweils eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

5.1.3 Verifizierung der mRNA-Stabilität der Fusionskonstrukte

In den oben geschilderten Experimenten war nicht auszuschließen, dass zur Gesamtproteinmenge nach Auswaschen von Doxyzyklin neben den bereits synthetisierten Proteinen auch Proteine beitrugen, die erst nach Abschalten der Genexpression *de novo* von stabiler Rest-mRNA translatiert worden waren. Im Folgenden sollte deshalb untersucht werden, ob nach Auswaschen von Doxyzyklin noch signifikante Mengen an Fusions-mRNA nachzuweisen waren. Dazu wurde die Genexpression wieder durch Zugabe von 1 μ g/ml Doxyzyklin für 24 h induziert, dann die Transkription durch Auswaschen gestoppt, und die Zellen 0, 4 und 24 h später geerntet. Anschließend wurde die RNA isoliert, die mRNA in cDNA umgeschrieben, und eine quantitative *RealTime*-PCR durchgeführt. Die mRNA-Menge aller drei Fusionskonstrukte war nach 4 h auf ungefähr ein Drittel reduziert, und nach 24 h kaum noch nachweisbar. Die nach Transkriptionsende nachgewiesene mRNA-Menge korrelierte

somit im Verlauf nicht mit der Menge des korrespondierenden, rekombinanten Antigens. Dieses Ergebnis sprach gegen einen signifikanten Einfluß von *de novo* Translation auf die Gesamtproteinmenge nach Auswaschen von Doxzyklin und für einen nahezu ausschließlichen Einfluß der Proteinstabilität (Abb. 5.3).

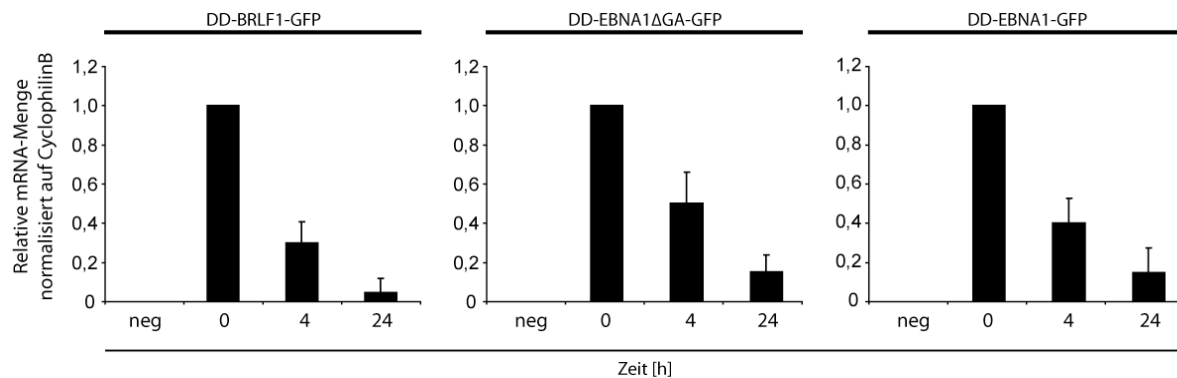


Abbildung 5.3: Untersuchung der Stabilität der DD-Antigen-GFP mRNAs

Die Expression der Fusionsgene wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Doxzyklin für 24 h induziert. Danach wurden die Zellen dreimal gewaschen, die RNA zu den angegebenen Zeitpunkten aus den Zellen isoliert, und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die Bestimmung der cDNA-Mengen erfolgte mittels quantitativer *RealTime*-PCR durch Verwendung von Oligonukleotiden spezifisch für GFP bzw. das *housekeeping*-Gen *CyclophilinB*. Die Berechnung der relativen mRNA-Mengen jeder Probe erfolgte durch Normalisierung der detektierten Fusions-cDNA-Mengen auf die entsprechenden Mengen von CyclophilinB. Repräsentativ dargestellt ist eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Für jeden Zeitpunkt dargestellt ist der Mittelwert sowie die aus der Dreifachbestimmung errechnete Standardabweichung.

5.1.4 Antigen-spezifische T-Zellerkennung der Transfektanten in Abhängigkeit von Intensität und Dauer der rekombinanten Proteinexpression

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluß von Intensität und Dauer der rekombinanten Proteinexpression auf die Erkennung der Modellantigene durch antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen, und damit indirekt ihr Einfluß auf die Effizienz der Antigenpräsentation gemessen werden.

Um zunächst zuverlässige Positivkontrollen zu etablieren, wurden die parentalen Zelllinien LCL1.11 und LCL-MSC mit unterschiedlichen Konzentrationen an BRLF1- bzw. EBNA1-Peptid beladen. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurden die peptidbeladenen Zellen sorgfältig gewaschen, um ungebundenes Peptid zu entfernen. Die gewaschenen Zellen wurden anschließend für 16 h mit BRLF1- bzw. EBNA1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen kokultiviert. Die Antigenerkennung führt zur Aktivierung der T-Zellen, die darauf mit der Produktion und Sezernierung von Zytokinen wie GM-CSF und IFN- γ reagierten. Abhängig von der verwendeten T-Zelllinie variierte das vorzugsweise sezernierte Zytokin. Proportional zur Antigenerkennung wurde im Fall der BRLF1-spezifischen T-Zelllinie IFN- γ und im Fall der EBNA1-spezifischen T-Zelllinie GM-CSF sezerniert. Ab einer Peptidkonzentration von wenigstens 10 nM kam es in beiden Fällen zu einer messbaren Zytokinsekretion.

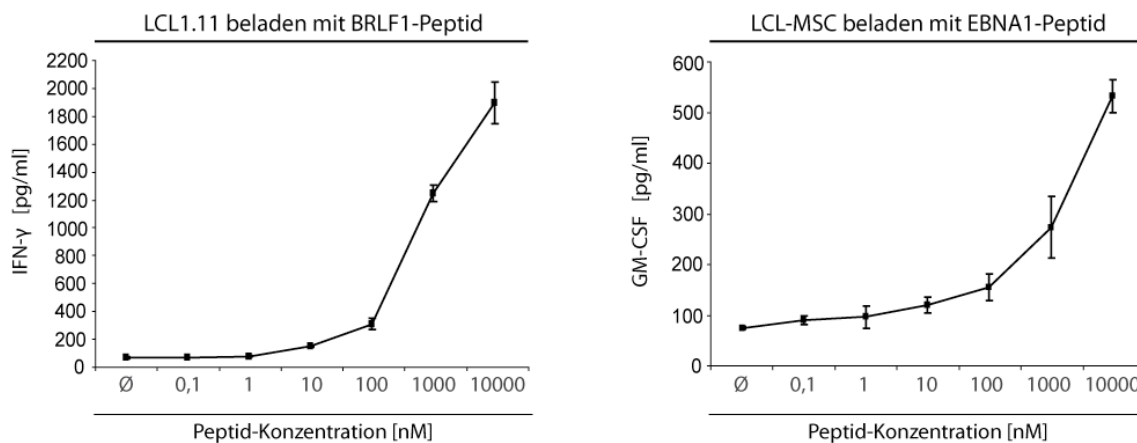


Abbildung 5.4: Spezifität und Sensitivität der verwendeten T-Zelllinien

LCL1.11 und LCL-MSC wurden mit steigenden Konzentrationen des von den jeweiligen T-Zellen erkannten BRLF1- bzw. EBNA1-Peptids beladen. Nach 2 h Inkubation wurde ungebundenes Peptid ausgewaschen und die peptidbeladenen Zellen mit antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen kokultiviert. Die von den T-Zellen sezernierte Menge an IFN- γ beziehungsweise GM-CSF, wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen.

Mit Hilfe von Kokultorexperimenten und antigenspezifischer Western-Blot-Analysen sollte anschließend untersucht werden, ob die stabil transfizierten LCL1.11 bzw. LCL-MSC-Zellen nach Induktion der rekombinanten Proteinexpression durch die antigenspezifischen $CD8^+$ T-

Zellen erkannt werden. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die Erkennung mit der Dosis des zugegebenen Doxyzyklins und diese mit dem Expressionsniveau der rekombinanten Antigene korreliert. Zu diesem Zweck wurden die Transfektanten zunächst jeweils für 36 h mit 30, 100, 300 und 1000 ng/ml Doxyzyklin behandelt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen über Nacht mit BRLF1- bzw. EBNA1-spezifischen T-Zellen kokultiviert. Außerdem dienten die Zellen für die Aufarbeitung von Proteinextrakten, um die Menge des rekombinanten Antigens mittels Western-Blot zu bestimmen. Mit steigender Doxyzyklin-Konzentration nahm sowohl die Antigenexpression als auch die Zytokinsekretion durch die T-Zellen zu (Abb. 5 A - B). Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass die T-Zellerkennung direkt von der Menge verfügbaren Antigens abhängig war.

Um herauszufinden, wann die antigenpräsentierenden Zellen frühestens nach Induktion der Genexpression durch die T-Zellen erkannt wurden, wurde die T-Zellerkennung auch in Abhängigkeit von der Induktionsdauer untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen erneut mit 1000 ng/ml Doxyzyklin behandelt, und nach unterschiedlichen Zeitpunkten die T-Zellen zugegeben. Für beide Zelllinien ergab sich eine Abhängigkeit der T-Zellerkennung von der Induktionsdauer. Diese war bereits nach 6 h detektierbar und stieg mit zunehmender Induktionsdauer kontinuierlich an (Abb. 5 C).

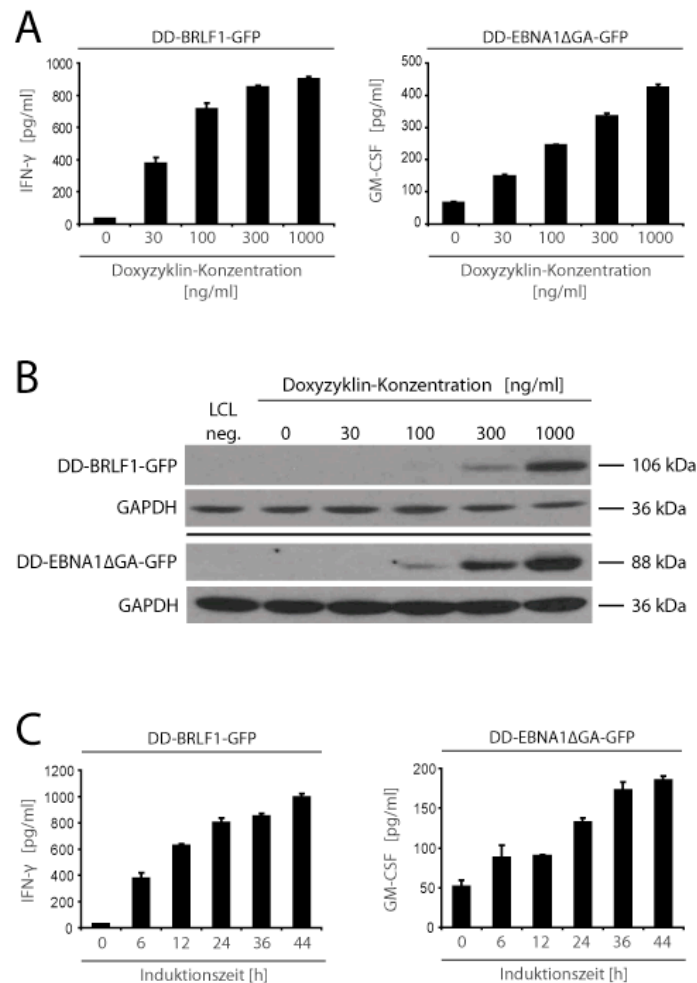


Abbildung 5.5: Die T-Zellerkennung der Transfektanten erfolgt

Doxyzyklindosis- und zeitabhängig

(A) Die stabilen DD-BRLF1-GFP und DD-EBNA1ΔGA-GFP Transfektanten wurden für 36 h mit steigenden Konzentrationen an Doxyzyklin behandelt und anschließend die Zytokinsekretion der T-Zellen mittels ELISA bestimmt. **(B)** Western-Blot-Analyse der Antigenexpression in den Doxyzyklin-behandelten Zellen. Durch Einsatz von anti-BRLF1-, anti-EBNA1- und anti-GAPDH-spezifischen Antikörpern konnte das Expressionsniveau der Doxyzyklin-induzierten rekombinanten Proteine im Vergleich mit dem Expressionsniveau des *housekeeping*-Proteins GAPDH dargestellt werden. **(C)** Die Genexpression in den DD-BRLF1-GFP- und DD-EBNA1ΔGA-GFP-Transfektanten wurde durch Zugabe von 1 μg/ml Doxyzyklin induziert, wobei die Induktionszeit zwischen 6 und 44 h lag. Unmittelbar am Ende der Induktionszeit wurden die antigenspezifischen T-Zellen zugegeben, und die T-Zellaktivierung mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Repräsentativ dargestellt ist jeweils eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifachbestimmungen im ELISA.

5.1.5 Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression durch Strip-Behandlung

Für die weiteren Experimente war es wichtig, das Niveau der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation zu einem bestimmten Zeitpunkt auf ein Referenzniveau auszurichten, um nachfolgend die Antigenpräsentation detektieren zu können, welche aus einer entsprechenden Behandlung der Zellen resultierten sollte. Aus diesem Grund sollte geprüft werden, ob sich die Peptide der eigenen Transfektanten ohne Viabilitätseinbußen effizient durch Puffer mit niedrigem pH aus MHC-Klasse-I-Bindetaschen, wie vorbeschrieben, eluieren lassen (Lee et al., 2004; Mackay et al., 2009). Zu diesem Zweck wurden die beiden stabil transfizierten Zelllinien LCL1.11-BR und LCL-MS-C-E1ΔGA für 24 h mit 1 µg/ml Doxzyklin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Strip-Puffer behandelt, direkt nach der Behandlung erneut in Anwesenheit von 1 µg/ml Doxzyklin für 6 h kultiviert und die Zellen mittels FACS und ELISA analysiert. Die Strip-Behandlung bewirkte nicht nur eine Abnahme der T-Zellerkennung (Abb. 5.6 B), sondern auch der MHC-Klasse-I-Expression der Strip-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 5.6 A). Aufgrund des Entfernens der Peptide aus den Antigenbindungstaschen der MHC-Klasse-I-Moleküle kam es vermutlich zu deren Destabilisierung und Internalisierung. Die Re-Induktion der Genexpression für 6 h führte jedoch wieder zu einem Anstieg der MHC-Klasse-I-Expression und der T-Zellerkennung. Die Strip-Behandlung wirkte sich somit nicht negativ auf die Viabilität der Zellen aus.

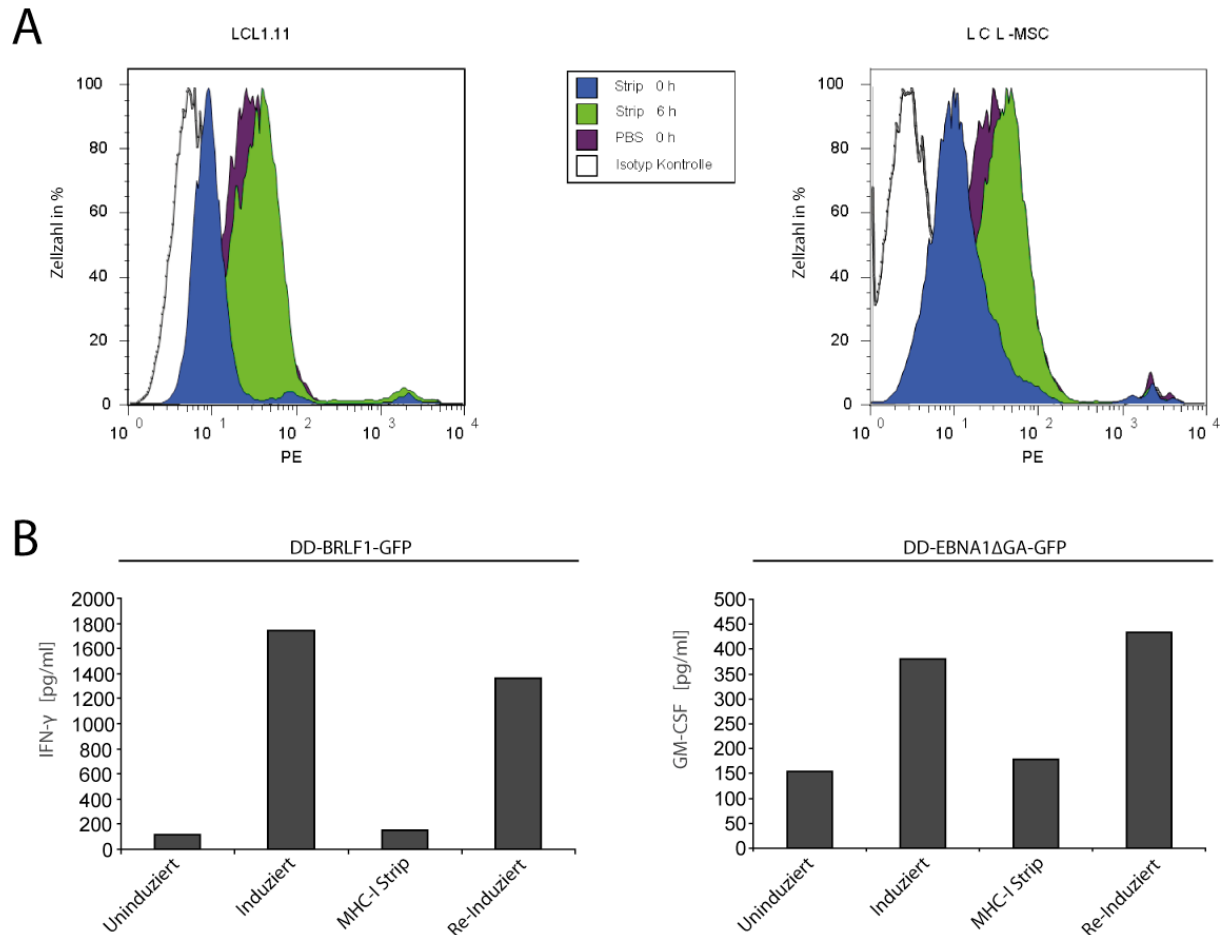


Abbildung 5.6: Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression und des Antigenpräsentationsniveaus durch Strip-Behandlung

Die stabilen Transfektanten LCL1.11-BR und LCL-MSC-E1ΔGA wurden für 24 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin behandelt (Induziert) und anschließend für 5 min bei 4°C in PBS oder MHC-I-Strip-Puffer inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen in PBS gewaschen und ein Teil der Zellen für weitere 6 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin weiter kultiviert (Re-Induziert). **(A)** Die induzierten Zellen wurden entweder mit einem Phycoerythrin-gekoppelten HLA-Klasse-I-spezifischen Antikörper oder einem Isotyp-spezifischen Kontroll-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert **(B)**. Alle Fraktionen wurden direkt nach dem Waschen bzw. nach erneuter Re-Induktion mit antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert und die T-Zellaktivierung mittels Zytokin-ELISA gemessen. Gezeigt ist eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

5.1.6 Mature Proteine tragen nicht zur MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation bei

In den folgenden Experimenten sollte der Beitrag maturer Proteine zur MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die rekombinanten Fusionsproteine DD-BRLF1-GFP bzw. DD-EBNA1ΔGA-GFP zunächst durch Doxyzyklinzugabe unter Shield1-Schutz in den Transfektanten induziert, die Proteinneosynthese dann gestoppt, die MHC-Klasse-I-Moleküle gestrippt und schließlich geprüft, wie sich ein anschließender Entzug von Shield1 auf das Expressionsniveau der maturen rekombinanten Proteine und auf die T-Zellerkennung auswirkte. Der Entzug von Shield1 resultierte erwartungsgemäß im Abbau des maturen rekombinanten Proteins, nicht aber in einer signifikanten T-Zellerkennung, so dass mature Proteine offensichtlich nicht wesentlich zur Antigenpräsentation an CD8⁺ T-Zellen beigetragen hatten (Abb. 5.6., jeweils erster bis vierter Ansatz von rechts).

Dieses Ergebnis wurde durch verschiedene Kontrollen verifiziert: In gänzlich unbehandelten Transfektanten fand sich erwartungsgemäß weder rekombinantes Protein, noch wurden die Transfektanten von den antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt (Abb. 5.6, jeweils erster Ansatz von links). Nach Induktion der Proteinsynthese durch Doxyzyklin unter Shield1-Schutz, zeigte sich erwartungsgemäß eine signifikante Menge rekombinanten Proteins und eine gute T-Zellerkennung (Abb. 5.6., jeweils zweiter Ansatz von links). Wenn zusätzlich die MHC-Klasse-I-Moleküle gestrippt wurden, ging die T-Zellerkennung verloren, das rekombinante Protein blieb jedoch geschützt (Abb. 5.6., jeweils dritter Ansatz von links). Als nach der Strip-Behandlung durch Zugabe von Doxyzyklin wieder neu synthetisiertes rekombinantes Protein verfügbar war, war erneut eine Antigenerkennung erkennbar (Abb. 5.6. A, jeweils vierter Ansatz von links). Wurde die rekombinante Proteinsynthese zwar durch Doxyzyklin-Zugabe induziert, aber gleichzeitig durch Zugabe des Translations-Inhibitors Cycloheximid (CHX) blockiert, fand sich erwartungsgemäß weder rekombinantes Protein noch eine T-Zellerkennung (Abb. 5.6., jeweils fünfter Ansatz von links). Wurde der proteosomale Abbau von Doxyzyklin-induziertem rekombinantem Protein durch Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 blockiert, resultierte dies zwar in einer Akkumulation des rekombinanten Proteins, führte jedoch nicht zu einer T-Zellerkennung (Abb. 5.6., jeweils sechster Ansatz von links).

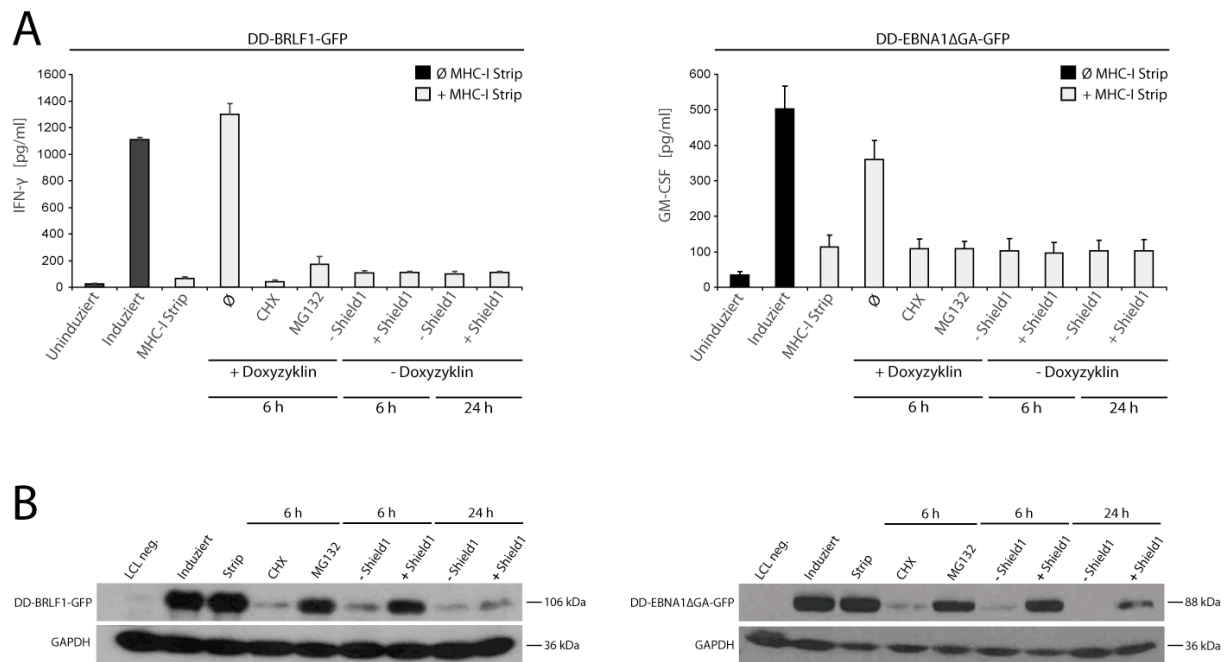


Abbildung 5.7: Ein verstärkter Abbau maturer Proteine resultiert nicht in einer vermehrten MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation an CD8⁺ T-Zellen

Alle hellgrau dargestellten stabilen Transfektanten LCL1.11-BR und LCL-MSC-E1 Δ GA wurden mit 1 μ g/ml Doxyzyklin und 0,5 μ M Shield1 für 36 h und anschließend für 5 min mit Strip-Puffer (MHC-I-Strip) behandelt. In einem Teil dieser Zellen wurde die Antigenexpression anschließend durch Zugabe von 1 μ g/ml Doxyzyklin für 6 h in An- oder Abwesenheit des Translations-Inhibitors Cycloheximid (CHX) oder des Proteasom-Inhibitors MG132 re-induziert. Ein anderer Teil der Zellen wurde ohne erneute Doxyzyklin-Zugabe für 6 oder 24 h in An- und Abwesenheit von Shield1 weiterkultiviert. **(A)** Die verschiedenen Zellfraktionen wurden mit antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert und die T-Zellaktivierung mittels Zytokin-ELISA gemessen. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifachbestimmungen im ELISA. **(B)** Von den verschiedenen Zellfraktionen wurden Zelllysate hergestellt und mittels Western-Blot und BRLF1-, EBNA1- oder GAPDH-spezifischer Antikörper die spezifischen Proteinmengen bestimmt. GAPDH diente als Ladekontrolle. Repräsentativ dargestellt ist jeweils eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit gleichen Ergebnissen.

5.1.7 Die Präsentation von EBNA1 auf MHC-Klasse-I ist abhängig von proteasomaler Prozessierung

Die im Vergleich zu EBNA1 Δ GA fehlende Destabilisierung von Wildtyp-EBNA1 durch DD bestätigte den bereits mehrfach beschriebenen, stabilisierenden Effekt des *GA-repeats*, der einen proteasomalen Abbau des Proteins verhindert (Daskalogianni et al., 2008; Levitskaya et al., 1997). Dennoch wurden aus verschiedenen EBV-infizierten Personen EBNA1-spezifische CD8⁺ T-Zellen isoliert, von denen in manchen Publikationen auch gezeigt wurde, dass sie EBV-infizierte B-Zellen erkennen (Lee et al., 2004; Tsang und Münz, 2011). Somit stellte sich die Frage, wie Epitope von EBNA1 generiert werden. Aufgrund der hohen Stabilität von maturem EBNA1 erschien eine enge Kopplung von Proteinsynthese und Antigenpräsentation als wahrscheinlich.

Um dies zu überprüfen, wurden DG75-Zellen mit EBNA1 beziehungsweise EBNA1 Δ GA sowie HLA-B*3501 Expressionsplasmiden transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Antigenpräsentation und die Proteinexpression der Transfektanten analysiert. In den EBNA1-Transfektanten wurden deutlich geringere Mengen des rekombinanten Proteins als in den EBNA1 Δ GA-Transfektanten nachgewiesen (Abb. 5.8 A), so dass der fehlende stabilisierende Einfluss des *GA-repeats* in den EBNA1 Δ GA-Transfektanten offensichtlich durch den vorbeschriebenen, negativen Effekt auf die Translationseffizienz kompensiert wurde (Apcher et al., 2010; Apcher et al., 2009; Cardinaud et al., 2010; Tellam et al., 2007). Nach Kokultur der beiden Transfektanten mit EBNA1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen konnten im Zytokin-ELISA allerdings keine gravierenden Unterschiede detektiert werden (Abb. 5.8 B), was darauf hinwies, dass das Ausmaß der Präsentation des untersuchten EBNA1-Epitops an CD8⁺ T-Zellen nicht mit der Proteinmenge korrelierte.

Um zu klären, ob die Prozessierung von EBNA1 aufgrund des *GA-repeats* tatsächlich Proteasom-unabhängig erfolgte, wurden DG75-Zellen entweder mit dem EBNA1- oder dem EBNA1 Δ GA-Expressionsplasmid transfiziert, und die Antigenpräsentation an CD8⁺ T-Zellen nach Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 untersucht. Zudem wurden alle Zellen mit zwei weiteren Plasmiden kotransfiziert, die zum einen für das Restriktionselement HLA-B*3501 und zum anderen für das YVL-Epitop von BRLF1 kodierten. Die Präsentation des Minigen-kodierten YVL-Epitops auf MHC-Klasse-I gilt als Proteasom-unabhängig und wird somit nicht durch die MG132-Behandlung beeinträchtigt (Wolf und Princiotta, 2011). Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion in zwei Fraktionen unterteilt und in An- oder

Abwesenheit des Proteasom-Inhibitors MG132 für 6 h weiterkultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,25 % PFA fixiert und mit EBNA1- bzw. YVL-Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. Die Hemmung des Proteasoms führte überraschenderweise sowohl in den EBNA1ΔGA- als auch in den EBNA1-Transfektanten zu einer Reduktion der Antigenpräsentation (Abb. 5.8 C). Diese Abnahme war nicht auf unspezifische, toxische Effekte des Inhibitors zurückzuführen, denn die Präsentation des YVL-Epitops, das keine proteosomale Prozessierung benötigte, war nach MG132-Behandlung unverändert. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass EBNA1 Translations-assoziiert und Proteasom-abhängig auf MHC-Klasse-I präsentiert wird. Folglich ist der *GA-repeat* nicht in der Lage, den proteosomalen Abbau neu synthetisierter Proteine zu verhindern, womöglich weil die hierfür notwendige Sekundärstruktur noch nicht ausgebildet wurde.

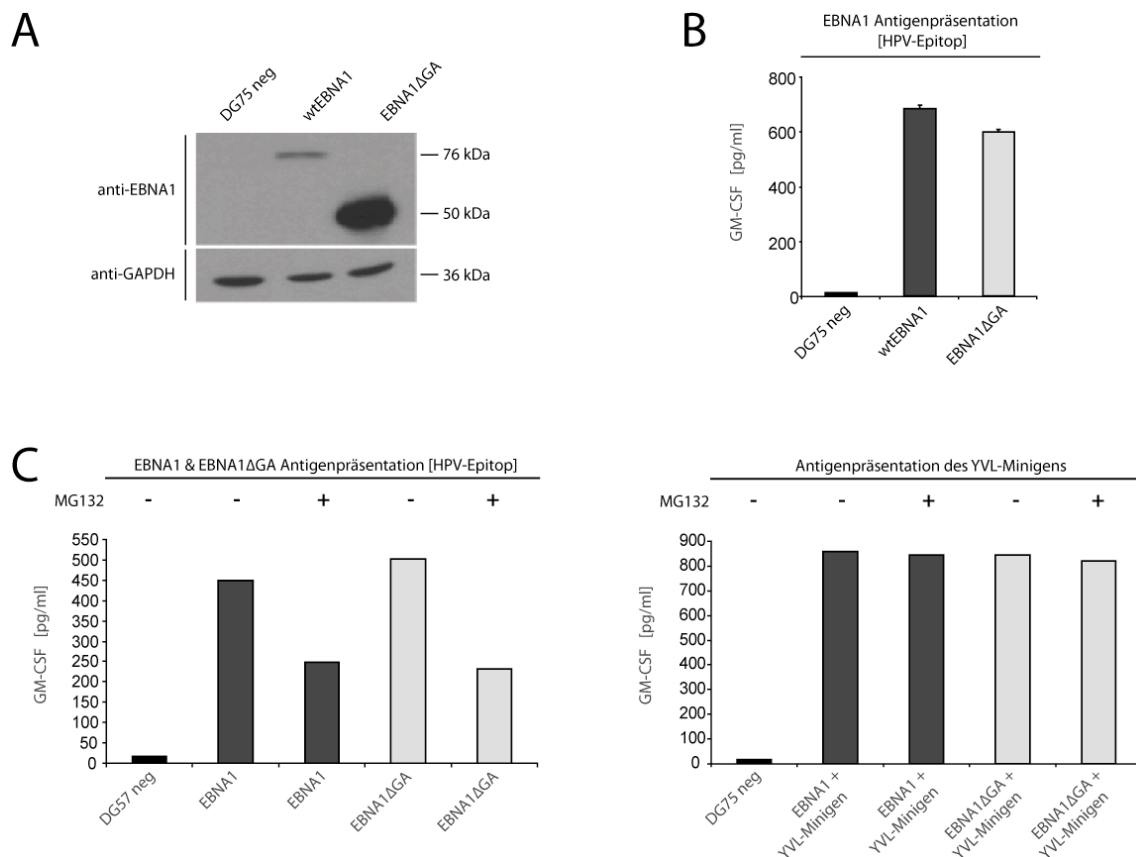


Abbildung 5.8: Vergleich der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation von Wildtyp-EBNA1 und EBNA1ΔGA in Abhängigkeit von Proteinexpressionsniveau und Aktivität des Proteasoms

DG75-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für EBNA1 bzw. EBNA1ΔGA sowie jeweils Expressionsplasmiden für das Restriktionselement HLA-B*3501 und das YVL-Epitop von BRLF1

kotransfiziert. **(A)** Die Mengen an EBNA1- und EBNA1ΔGA-Protein wurden 30 h nach Transfektion mit Hilfe eines EBNA1-spezifischen Antikörpers im Western-Blot gemessen. Das *housekeeping*-Protein GAPDH diente als Ladekontrolle. **(B)** 24 h nach Transfektion wurden EBNA1-spezifische CD8⁺ T-Zellen zugesetzt, und nach weiteren 20 h die T-Zellerkennung mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifachbestimmungen im ELISA. **(C)** Die transfizierten Zellen wurden 24 h nach Transfektion in zwei Fraktionen geteilt und jeweils eine Fraktion für 6 h mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt oder unbehandelt weiterkultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,25 % Paraformaldehyd fixiert und über Nacht mit EBNA1- bzw. BRLF1-YVL-spezifischen T-Zellen kokultiviert. Die T-Zellaktivierung wurde mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Alle dargestellten Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, wobei jeweils eines dieser Experimente repräsentativ gezeigt ist.

5.2 Einfluss der Antigen-mRNA auf die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation

5.2.1 Die Stabilität der Antigen-mRNA hat keinen Einfluss auf die Effizienz der Antigengenerierung

Die nachgewiesene Kopplung der Antigenpräsentation an die Antigensynthese lässt vermuten, dass eine hohe Stabilität der Antigen-mRNA möglicherweise über mehrere Translationszyklen zu erhöhten Antigenspiegeln und eventuell darüber hinaus zu einer verbesserten MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation führen sollte. Jedoch zeigten neuere Untersuchungen von Apcher und Kollegen (Apcher et al., 2011), dass eine Destabilisierung der Antigen-mRNA nicht in einer verminderten Antigenpräsentationsrate resultiert. Daraus leiteten die Autoren die Hypothese ab, dass Antigene während der ersten Runde der Translation generiert werden. Die erste Translationsrunde zeichnet sich gegenüber weiteren Runden dadurch aus, dass *exon-junction*-Komplexe (*exon junction complex*; EJC), die während des Spleißens auf der mRNA deponiert worden waren, zum Zwecke der Translation entfernt werden. Man könnte demnach postulieren, dass dieser

Unterschied für die Generierung von Antigenen von Bedeutung ist. Da allerdings viele virale Antigene von ungespleißten mRNAs abstammen, müsste man für diese Antigene andere Gesetze der Antigengenerierung annehmen.

In der eigenen Arbeit sollte anhand des viralen Antigens BZLF1 untersucht werden, ob Translationsprodukte gespleißter versus ungespleißter Transkripte unterschiedlich effizient präsentiert werden. Darüber hinaus sollte getestet werden, inwieweit sich die Stabilität von viralen mRNAs auf die Antigenpräsentation auswirkt. Um die BZLF1-mRNA-Stabilität zu modifizieren, wurde ein prämaures Stopp-Codon (*premature termination codon*; PTC) am Ende des zweiten Exons im insgesamt drei Exons umfassenden *BZLF1*-Gen eingeführt. Dadurch sollte während der ersten Runde der Translation der mRNA-Qualitätskontrollmechanismus NMD (*nonsense mediated mRNA decay*; NMD) aktiviert werden, der zu einem raschen Abbau der mRNA führt (Conti und Izaurralde, 2005) (Abb. 5.9).

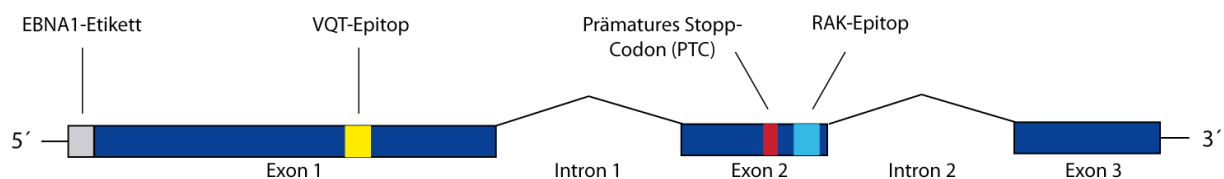


Abbildung 5.9: Schematische Darstellung der mRNA des Modellantigens BZLF1

In das drei Exons umfassende *BZLF1*-Gen wurde eine Punktmutation im zweiten Exon eingeführt, wodurch ein Stopp-Codon entstand. Dieses prämaure Stopp-Codon (PTC) sollte während der ersten Runde der Translation zur Aktivierung des mRNA-Qualitätskontrollmechanismus *nonsense mediated mRNA decay* führen und im Abbau der mRNA resultieren. VQT und RAK kennzeichnen T-Zell-Epitope, gegen die BZLF1-spezifische T-Zellen zur Verfügung standen.

Um zu verifizieren, dass das PTC den NMD-Mechanismus aktivierte, wurden DG75-Zellen entweder mit einem für Wildtyp-BZLF1 kodierenden Plasmid oder mit dem BZLF1+PTC-Expressionsplasmid transfiziert. Die Kultivierung der transfizierten Zellen erfolgte für 24 h, wobei jeweils eine Fraktion beider Transfektanten für die letzten 6 h zusätzlich mit Cycloheximid (CHX) behandelt wurde. Danach wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert. Nach reverser Transkription wurde mittels quantitativer *RealTime*-PCR untersucht,

ob sich die Stabilität der mRNA durch die Präsenz des PTC verändert hatte. Im Gegensatz zur Wildtyp-BZLF1-mRNA war die Menge der PTC-tragenden mRNA kaum detektierbar. Die Inhibition der Translation mittels CHX führte aber zu einer deutlichen Stabilisierung der mRNA, was auf einen translationsassoziierten Abbau, vermutlich über den NMD-Mechanismus, hinwies (Abb. 5.10 A). Zudem wurde deutlich mehr Wildtyp- als trunkiertes Translationsprodukt in den Zellen detektiert, was als weiterer Hinweis auf eine verminderte Stabilität der mutierten mRNA gewertet werden konnte.

Um die Auswirkung der mRNA-Stabilität auf die Antigenpräsentation zu untersuchen, wurden zwei CD8⁺ T-Zelllinien verwendet, die die Epitope RAK und VQT in BZLF1 erkannten. Während das VQT-Epitop vor dem PTC lokalisiert war und von beiden BZLF1-Varianten exprimiert werden sollte, befand sich das RAK-Epitop hinter dem PTC. Wie erwartet erkannten die RAK-Epitop-spezifischen T-Zellen nur das Wildtyp-Protein, aber nicht das trunkierte BZLF1 (Abb. 5.10 C). Dagegen erkannten die VQT-Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen beide BZLF1-Transfektanten mit ähnlicher Effizienz. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Stabilität der mRNA keinen Einfluss auf die Antigenpräsentation hatte und unterstützten die von Apcher und Kollegen (Apcher et al., 2011) postulierte Hypothese, dass die gesamte Menge an Antigen während der ersten Runde der Translation generiert wird.

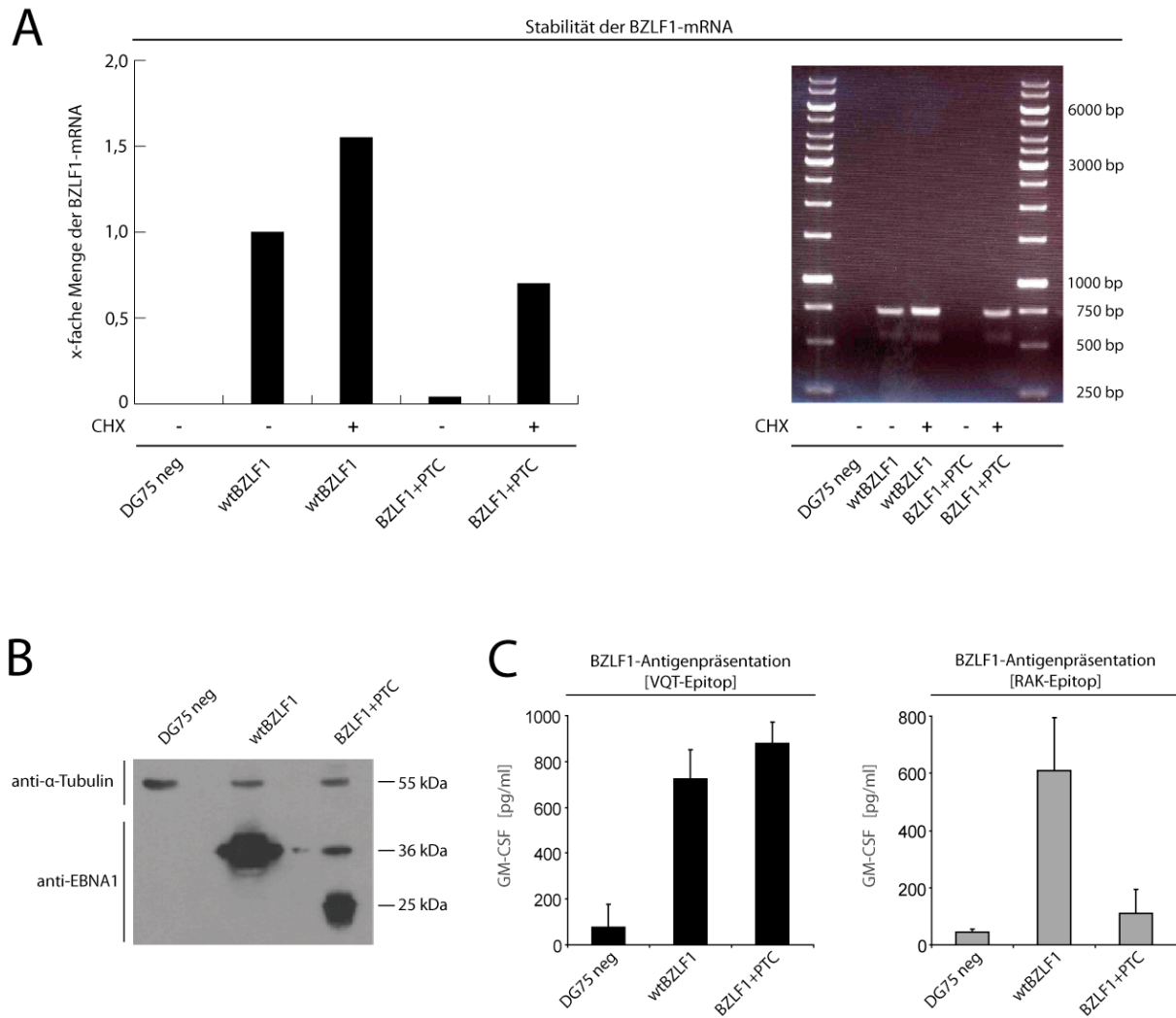


Abbildung 5.10: Die Antigengenerierung erfolgt vermutlich während der ersten Runde der Translation

(A) DG75-Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden für Wildtyp-BZLF1 oder der BZLF1+PTC-Mutante transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 6 h mit dem Translations-Inhibitor Cycloheximid (CHX) behandelt oder unbehandelt weiterkultiviert, anschließend die RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Die BZLF1-cDNA-Mengen wurden mittels quantitativer *RealTime*-PCR analysiert (linke Bildhälfte). Die mRNA des *housekeeping*-Gens *CyclophilinB* diente dabei zur Normalisierung der Transkriptmengen. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden zudem in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (rechte Bildhälfte). **(B)** Aus den transfizierten DG75-Zellen wurden Zelllysate hergestellt, und die Proteinmengen von Wildtyp-BZLF1 (36 kDa) und der BZLF1+PTC-Mutante (25kDa) im Western-Blot bestimmt. Da beide rekombinanten Proteine ein N-terminales EBNA1-Etikett trugen, war es möglich, die Proteine mit Hilfe eines EBNA1-spezifischen Antikörpers zu detektieren. Als Ladekontrolle wurde das *housekeeping*-Protein α -Tubulin mit

einem α -Tubulin-spezifischen Antikörper detektiert. **(C)** DG75-Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden für Wildtyp-BZLF1 oder der BZLF1+PTC-Mutante, zusammen mit den Restriktionsmolekülen HLA-B*0801 und HLA-B*1501 kotransfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit den BZLF1-VQT- und BZLF1-RAK-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert und die Zielzellerkennung mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Da das PTC vor dem RAK-Epitop eingeführt worden war, wurden Zellen, die das trunkierte BZLF1 exprimierten, von den RAK-spezifischen T-Zellen nicht erkannt. Repräsentativ dargestellt ist jeweils eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifachbestimmungen im ELISA.

Um vermeintliche Sättigungseffekte, bedingt durch eventuell zu hohe Konzentrationen der verwendeten Plasmid-DNA, auszuschließen, wurde eine Titration der entsprechenden Plasmid-DNA durchgeführt. Dabei wurden DG75-Zellen mit jeweils 0,1 μ g, 1,0 μ g und 10,0 μ g des Wildtyp-BZLF1-Plasmids oder der BZLF1+PTC-Mutante transient transfiziert. Anschließend wurde die Präsentation des VQT-Epitops beider rekombinanten Proteine anhand der Erkennung durch VQT-spezifische CD8⁺ T-Zellen im Zytokin-ELISA gemessen. Konzentrationsabhängig kam es nach Transfektion beider Plasmide zu einem Anstieg der T-Zellerkennung. Ein DNA-Sättigungseffekt konnte somit als Ursache für die in Abbildung 5.10. präsentierten Ergebnisse ausgeschlossen werden (Abb. 5.11).

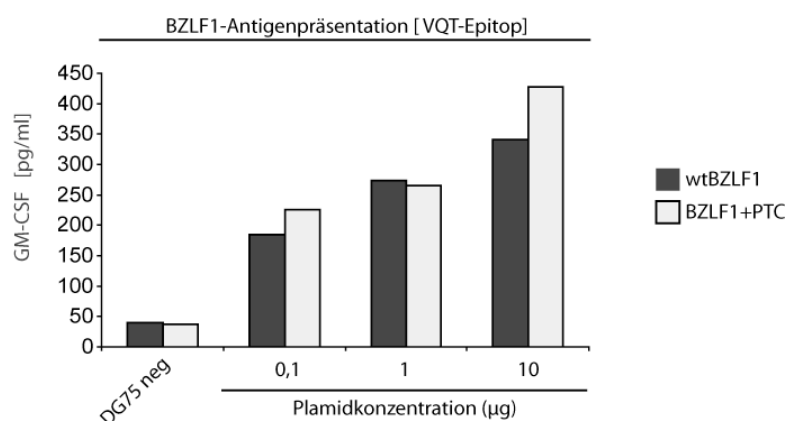


Abbildung 5.11: Positive Korrelation der VQT-spezifischen T-Zellerkennung mit der DNA-Konzentration der beiden BZLF1 -Expressionsplasmide

DG75-Zellen wurden mit steigenden Mengen an Wildtyp-BZLF1 und BZLF1+PTC-Expressionsplasmid zusammen mit dem Restriktionsmolekül HLA-B*1501 kotransfiziert und 24

h später mit VQT-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. Die Erkennung der transfizierten Zellen durch VQT-spezifische T-Zellen wurde mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ist repräsentativ dargestellt

5.2.2 Destabilisierende Elemente in der 3'untranslatierten Region der BZLF1-mRNA zeigen keinen Einfluss auf die Effizienz der Antigenpräsentation

Wie auch in den Untersuchungen von Apcher und Kollegen (Apcher et al., 2011) wurde in den oben beschriebenen Experimenten die Stabilität der Antigen-mRNA durch die Einführung eines PTC und den dadurch vermutlich ausgelösten NMD moduliert. Eine Abhängigkeit der Antigenpräsentation von der mRNA-Stabilität konnte in diesen Untersuchungen jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Womöglich verbesserte die Trunkierung des antigenen Proteins dessen Prozessierung und überdeckte so mögliche Effekte der mRNA-Stabilität auf die Antigenpräsentation. Deshalb sollte in nachfolgenden Experimenten der Einfluss der mRNA-Stabilität anhand von mRNA-Varianten untersucht werden, die den gleichen offenen Leserahmen enthielten.

Dazu wurde die 3'UTR (*untranslated region*; UTR) von IFN- γ oder β -Globin an den offenen Leserahmen von BZLF1 angefügt. Die 3'UTR der IFN- γ -mRNA beeinflusst deren Stabilität negativ (Mavropoulos et al., 2005; Nagy et al., 1994), während die 3'UTR von β -Globin eine höhere Stabilität und Halbwertszeit der mRNA vermittelt und deshalb als Kontrolle diente (Yu und Russell, 2001). Mit diesen beiden Konstrukten wurden DG75-Zellen transient transfiziert und die Menge an spezifischen Transkripten in den Zellen 24 h später mittels quantitativer *RealTime*-PCR bestimmt. Wie erwartet führte das Anfügen der IFN- γ -3'UTR zu einer drastischen Abnahme der Transkriptmenge, die vermutlich auf eine Destabilisierung des Transkripts zurückzuführen war. Überraschenderweise bedingte allerdings auch das Anfügen der 3'UTR von β -Globin, verglichen mit der BZLF1-Wildtyp-mRNA, eine Reduktion der Transkriptmenge (Abb. 5.12 A). Die Gründe für diese unerwartete Abnahme sind bislang nicht bekannt. Die BZLF1-Proteinmengen in den transfizierten Zellen korrelierten mit den jeweiligen BZLF1-mRNA-Mengen (Abb. 5.12 B).

Um zu testen, ob sich die Unterschiede der Antigen-mRNA-Mengen auch in einer unterschiedlich effizienten Antigenpräsentation widerspiegeln, wurden DG75-Zellen 24 h nach Transfektion mit BZLF1-spezifischen T-Zellen kokultiviert und mittels Zytokin-ELISA die

T-Zellerkennung gemessen. Wie in Abbildung 5.12 gezeigt, wurden die mit den unterschiedlichen Expressionskonstrukten transfizierten Zielzellen ähnlich gut von den T-Zellen erkannt. Die Effizienz der Antigengenerierung wurde somit nicht durch ein destabilisierendes Element in der 3'UTR der mRNA beeinflusst. Auch diese Experimente bestätigten die Hypothese, dass die Antigene während der ersten Runde der Translation generiert werden.

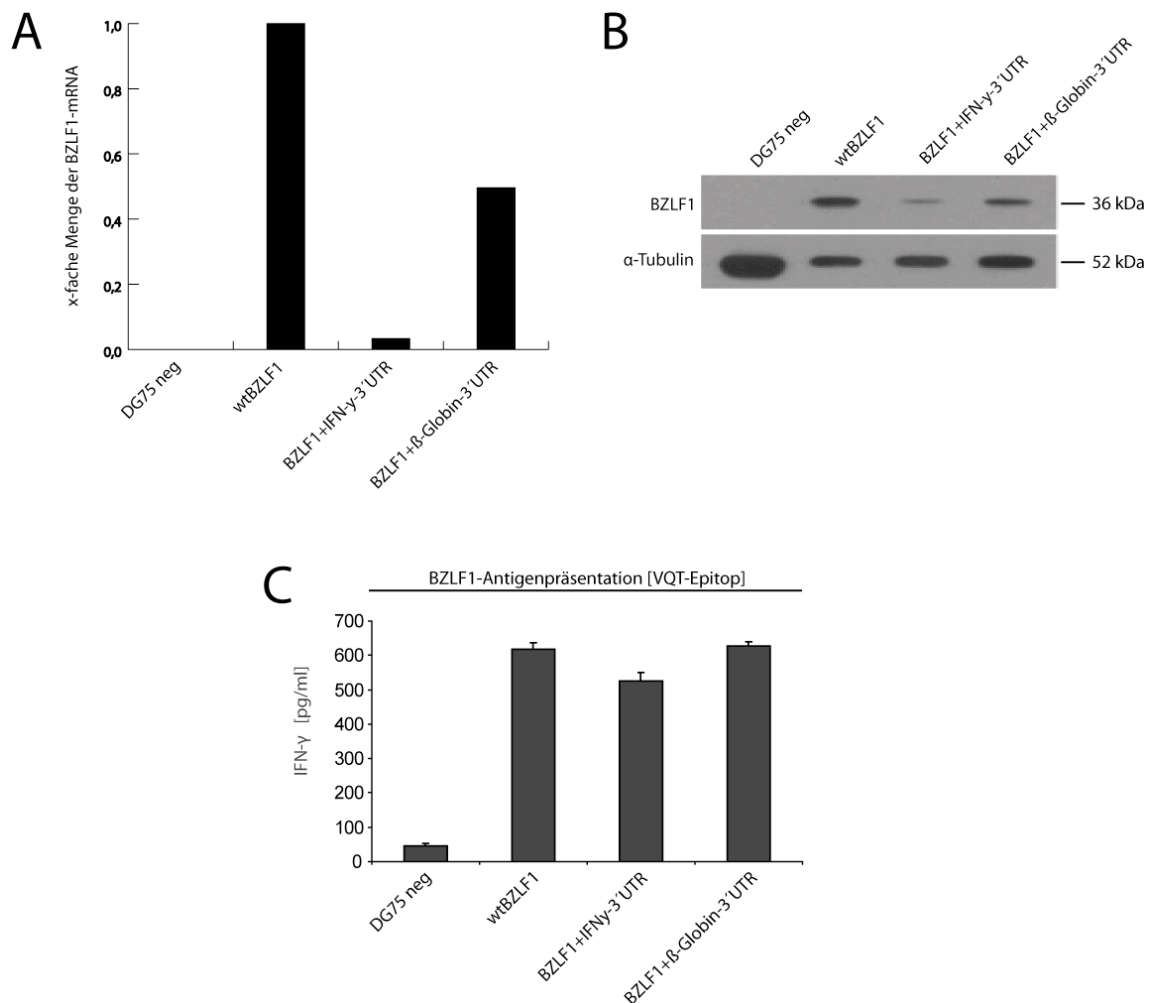


Abbildung 5.12: Das Anfügen einer destabilisierenden 3'UTR an die BZLF1-mRNA

beeinträchtigt nicht die Präsentation von BZLF1 auf MHC-Klasse-I

DG75-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für BZLF1 ohne 3'UTR (wtBZLF1) sowie BZLF1 mit 3'UTR von IFN-γ (BZLF1+IFN-γ-3'UTR) bzw. β-Globin (BZLF1+β-Globin-3'UTR) transient transfiziert. **(A)** 24 h nach Transfektion wurde die RNA isoliert, die mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer *RealTime*-PCR die BZLF1-mRNA-Mengen bestimmt. Die Normalisierung der BZLF1-mRNA-Mengen erfolgte durch Berechnung der relativen mRNA-Menge in Bezug auf die mRNA des *housekeeping*-Gens *CyclophilinB*. **(B)** Durch den Einsatz

eines BZLF1-spezifischen Antikörpers wurde die Expression der rekombinanten Proteine im Western-Blot untersucht. α -Tubulin diente hierbei als Ladekontrolle. **(C)** Die Effizienz der Antigenpräsentation wurde indirekt über die Aktivierung der VQT-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Zytokin-ELISA gemessen. In diesem Fall wurden die Zellen zusätzlich mit dem Restriktionsmolekül HLA-B*1501 kotransfiziert. Repräsentativ dargestellt ist jeweils eines von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifachbestimmungen im ELISA.

5.2.3 Die Antigengenerierung setzt kein Spleißen der mRNA voraus

Eine Generierung der Antigene während der ersten Runde der Translation setzt eine Markierung und zelluläre Erkennung neu hergestellter mRNA voraus, beispielsweise durch die Anwesenheit EJC (Le Hir et al., 2000b). Um die Bedeutung der EJCs für die Antigengenerierung zu untersuchen, wurden Expressionsvektoren erstellt, die anstelle der genomischen Sequenzen von Wildtyp-BZLF1 und BZLF1+PTC die cDNA-Sequenz enthielten und diese in DG75-Zellen transfiziert. Durch die fehlenden Introns in der cDNA sollten keine EJCs auf der mRNA deponiert werden, da kein Spleißen der mRNA erforderlich ist. Zielzellen, die mit dem BZLF1-cDNA- bzw. dem genomischen BZLF1-Expressionskonstrukt transfiziert worden waren, wurden ähnlich gut von den BZLF1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt (Abb. 5.13). Die Antigengenerierung schien demnach nicht ein Markieren der mRNA mit EJC und Spleißen vorauszusetzen.

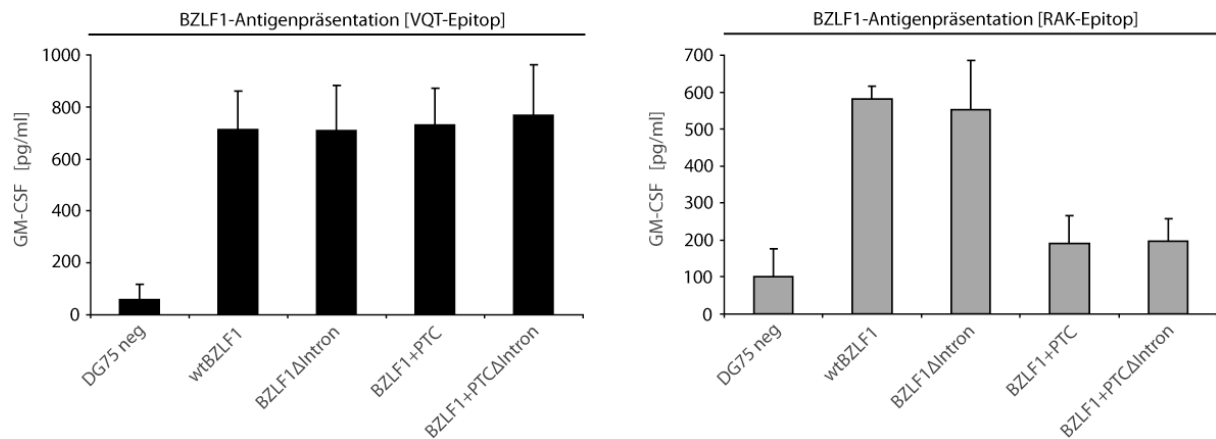


Abbildung 5.13: Die Antigengenerierung gespleißter und ungespleißter mRNA erfolgt mit vergleichbarer Effizienz

DG75-Zellen wurden mit BZLF1-Expressionsplasmiden transfiziert, die entweder die genomische (wtBZLF1) oder die cDNA-Sequenz (BZLF1ΔIntron) von BZLF1 trugen. Zudem wurden auch entsprechende Expressionsplasmide der PTC-tragenden BZLF1-Konstrukte (BZLF1+PTC und BZLF1+PTCΔIntron) transfiziert. Alle Ansätze wurde zusätzlich mit den Restriktionsmolekülen HLA-B*0801 und HLA-B*1501 kotransfiziert. Nach Kokultur mit BZLF1-VQT- und BZLF1-RAK-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde ein Zytokin-ELISA durchgeführt, um die T-Zellaktivierung zu messen. Eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ist repräsentativ gezeigt. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifachbestimmungen im ELISA.

5.2.4 Die Bedeutung mRNA-assoziierter Faktoren in der Antigengenerierung

Neben Proteinen und Proteinkomplexen, die die Spleißstellen markieren, ist die aus dem Zellkern exportierte mRNA mit weiteren nukleären Proteinen assoziiert, welche mit der mRNA-Prozessierung oder auch deren Export aus dem Zellkern ins Zytoplasma zusammenhängen (Cole und Scarcelli, 2006; Cullen, 2003; Kohler und Hurt, 2007). Um die Rolle dieser Faktoren in der Generierung von Antigenen zu analysieren, wurde ivtRNA für BZLF1, die frei von assoziierten Proteinen ist, in Zellen transfiziert und die Erkennung durch BZLF1-spezifische T-Zellen analysiert. Um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen, wurde 6 und 24 h nach Transfektion die RNA aus den transfizierten Zellen wieder isoliert und mittels quantitativer *RealTime*-PCR analysiert. Wie zu erwarten, nahm in den Zellen die Menge an BZLF1-ivtRNA wesentlich schneller ab, als die Menge an BZLF1-mRNA nach

Transfektion eines BZLF1-Expressionsplasmids. In letzterem Fall kam es bis zum Verlust des Plasmids zu einer ständigen Neusynthese des BZLF1-Transkripts. Allerdings waren etwa 6 h nach Transfektion die RNA-Mengen ähnlich (Abb. 5.14 A). Aus diesem Grund wurden zu diesem Zeitpunkt die transfizierten Zellen mit BZLF1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen über Nacht kokultiviert und dann deren Aktivierung im Zytokin-ELISA gemessen. Das Ausmaß der T-Zellerkennung war unter beiden Bedingungen vergleichbar (Abb. 5.14 B). Nukleäre Faktoren, die mit der mRNA assoziiert sind, sind somit für die Antigengenerierung nicht notwendig.

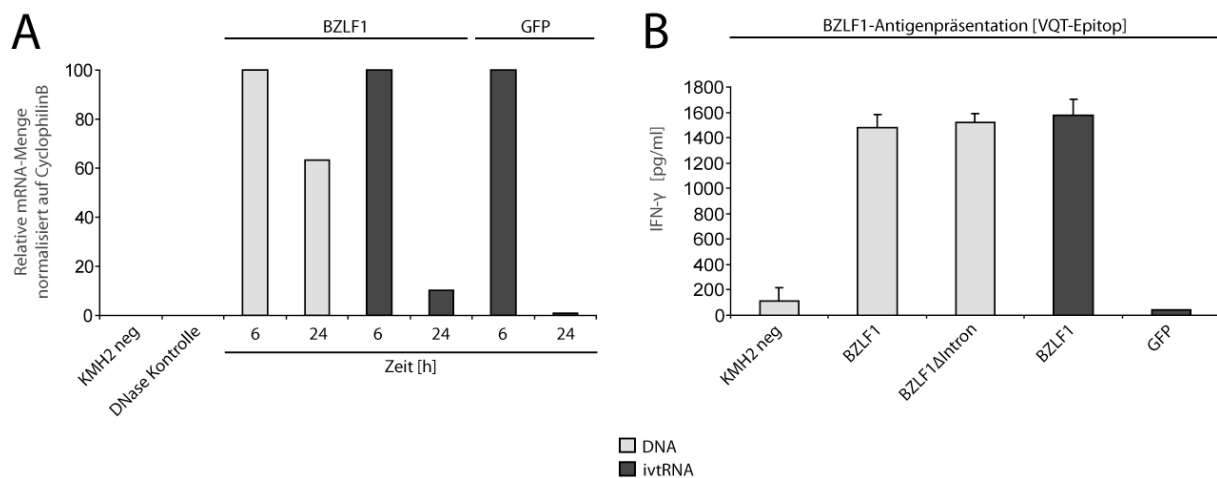


Abbildung 5.14: Antigene, die nach Transfektion von in vitro transkribierter BZLF1-RNA translatiert werden, werden effizient an BZLF1-spezifische CD8⁺ T-Zellen präsentiert

KMH2-Zellen wurden mit je 10 µg der Expressionsplasmide mit genomischer (BZLF1) oder cDNA-Sequenz von BZLF1 (BZLF1 ΔIntron) oder mit 10 µg in vitro transkribierter (ivt) BZLF1-RNA und, als Kontrolle, ivtGFP-RNA transfiziert. **(A)** 6 und 24 h nach Transfektion wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe quantitativer *RealTime*-PCR die RNA-Menge zu beiden Zeitpunkten gemessen. Die mRNA des *housekeeping*-Gens *CyclophilinB* diente der Normalisierung für die Berechnung der relativen RNA-Mengen. Dargestellt ist die prozentuale Abnahme der RNA-Menge zwischen Zeitpunkt 6 und 24 h (6 h = 100 %). **(B)** 6 h nach Transfektion wurden die Zellen mit BZLF1-spezifischen T-Zellen über Nacht kokultiviert und mittels Zytokin-ELISA die jeweilige T-Zellerkennung ermittelt. Dargestellt ist jeweils eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifachbestimmungen im ELISA.

5.2.5 Die Antigengenerierung erfolgt nach CAP-abhängiger und CAP-unabhängiger mRNA-Translation

Da die Antigengenerierung bekanntlich gekoppelt mit der Proteinsynthese erfolgt, stellte sich die Frage, ob dies in direktem Zusammenhang mit unterschiedlichen Formen der Translationsinitiation steht. Die klassische Translationsinitiation in eukaryotischen Zellen erfolgt am 5'-Ende der mRNA an der sogenannten 5'-CAP-Struktur. Diese schützt einerseits die mRNA vor Degradation und vermittelt andererseits die Interaktion mit Translationsinitiationsfaktoren, wodurch die Proteinsynthese eingeleitet wird. Im Gegensatz dazu kann es auch zur CAP-unabhängigen Translationsinitiation an sogenannten internen ribosomalen Eintrittsstellen (IRES) kommen. Diese Sequenzbereiche bewirken eine spezifische Faltung der mRNA, was eine Bindung der mRNA an Ribosomen unabhängig von Initiationsfaktoren ermöglicht (Galkin et al., 2007). Um zu untersuchen, ob beide Formen der Translationsinitiation zur Antigengenerierung beitragen, wurden die beiden Expressionsplasmide BZLF1-IRES-GFP und GFP-IRES-BZLF1 erstellt und transient in Zielzellen transfiziert. Obwohl das Proteinexpressionsniveau nach CAP-abhängiger Translation wesentlich höher war als nach CAP-unabhängiger Einleitung der Proteinsynthese (Abb. 5.15 A), konnten keine Unterschiede in der Effizienz der Antigenpräsentation detektiert werden (Abb. 5.15 B). Dies ließ darauf schließen, dass beide Formen der Translationsinitiation zur Antigengenerierung führen und dass Unterschiede in der Translationseffizienz keinen Einfluss auf die Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I haben.

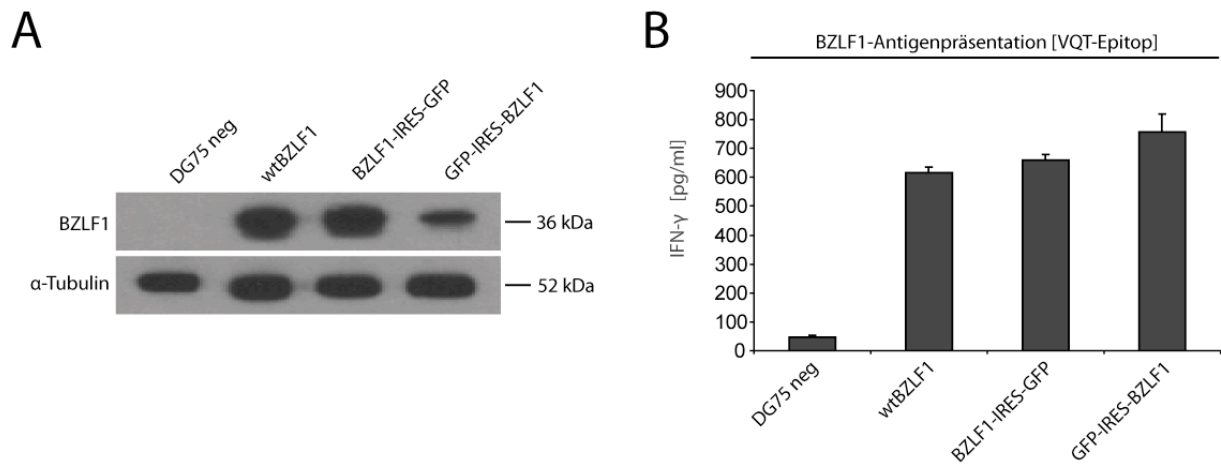


Abbildung 5.15: Generierung von Antigen durch CAP-vermittelte und CAP-unabhängige Translationsinitiation

DG75-Zellen wurden mit BZLF1-, BZLF1-IRES-GFP-, bzw. GFP-IRES-BZLF1-Expressionsplasmiden wie auch dem Restriktionsmolekül HLA-B*1501 transient kotransfiziert. **(A)** Die Expression des BZLF1-Proteins wurde mit Hilfe eines Western-Blots analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe eines an den C-Terminus von BZLF1 angefügten His₆-Etiketts und eines Etikett-spezifischen Antikörpers. α-Tubulin diente als Ladekontrolle. **(B)** Die unterschiedlichen Transfektanten wurden mit antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen über Nacht kokultiviert und anschließend die T-Zellaktivierung im Zytokin-ELISA gemessen. Repräsentativ dargestellt ist jeweils eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifachbestimmungen im ELISA.

5.3 Die Rolle der Ubiquitinylierung in der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation

5.3.1 Die Präsentation von BZLF1 und MART-1 auf MHC-Klasse-I erfolgt Proteasom-abhängig

In den letzten Jahren konnte in zahlreichen Veröffentlichungen gezeigt werden, dass der proteasomale Abbau von Proteinen über eine reversible Ubiquitin-abhängige Modifikation des Substratproteins erfolgt (Goldberg et al., 2002; Mo et al., 1999; Rock et al., 2010; Rock et al., 1994; Sijts und Kloetzel, 2011). Da die proteasomale Degradation eine essentielle Rolle in der Antigenprozessierung einnimmt (Guillaume et al., 2012; Lu et al., 2012), lag es nahe anzunehmen, dass auch die Ubiquitinylierung für die Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I essentiell ist. Diese Hypothese sollte anhand von zwei Modellantigenen, dem viralen Protein BZLF1 und dem zellulären Protein MART-1, geprüft werden.

Zunächst sollte getestet werden, ob BZLF1 und MART-1 proteasomal degradiert werden. Zu diesem Zweck wurden Expressionsplasmide für die Fusionsproteine BZLF1-GFP und MART-1-GFP hergestellt und diese in DG75-Zellen transfiziert. 16 h nach Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit 10 μ M des Proteasom-Inhibitors MG132 behandelt und anschließend die Grünfluoreszenz durchflusszytometrisch analysiert. Beide Fusionsproteine wurden durch Inhibition des Proteasoms stabilisiert (Abb. 5.16).

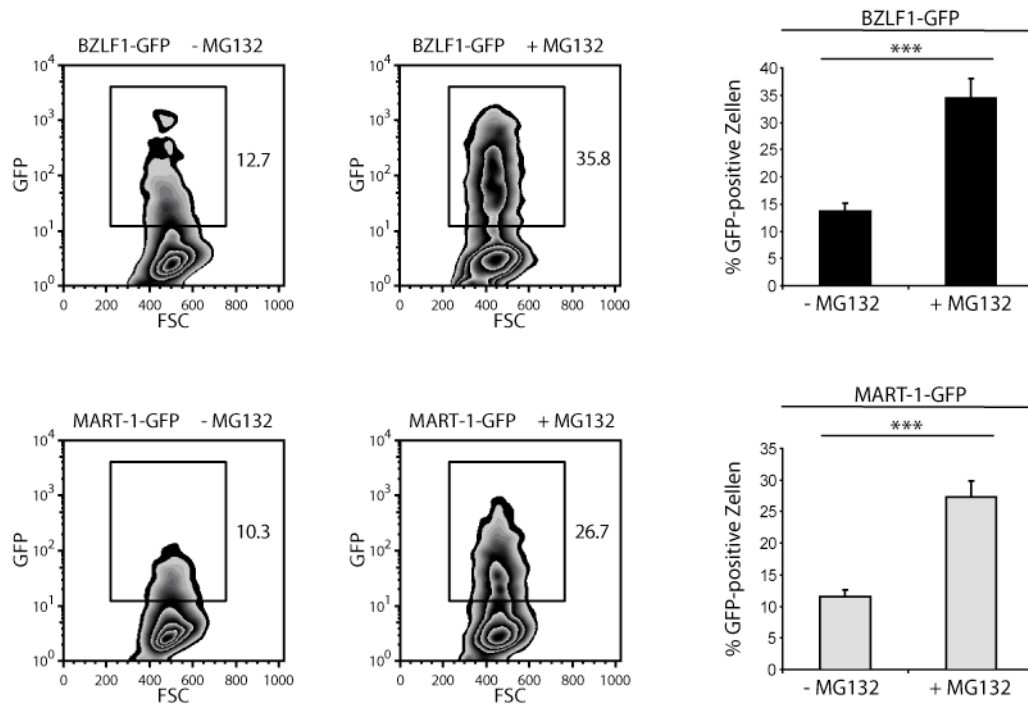


Abbildung 5.16: Proteasom-abhängige Stabilität der Fusionsproteine

BZLF1-GFP- bzw. MART-1-GFP

DG75-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für BZLF1-GFP und MART-1-GFP transfiziert. 16 h nach Transfektion wurden die Zellen auf zwei Fraktionen aufgeteilt, die jeweils für weitere 6 h in An- oder Abwesenheit des Proteasom-Inhibitors MG132 weiterkultiviert wurden. Anschließend wurde die GFP-abhängige Grünfluoreszenz aller vier Zellfraktionen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen eines repräsentativen Experiments. Für jedes rekombinante Protein wurde das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente, mit und ohne MG132, inklusive Standardabweichungen zusammengefaßt (rechte Grafiken). Die statistische Signifikanz wurde durch Verwendung des ungepaarten *t*-Tests berechnet (***) p-Wert < 0,001).

Im zweiten Schritt sollte untersucht werden, ob der proteasomale Abbau für die Präsentation der rekombinanten Antigene an CD8⁺ T-Zellen erforderlich war. Da zum Zeitpunkt dieser Experimente keine MART-1-, aber BRLF1-spezifische CD8⁺ T-Zellen verfügbar waren, wurde das YVL-Epitop des viralen Antigens BRLF1 C-terminal an den offenen Leserahmen von MART-1 fusioniert (MART-1-YVL) (Abb. 5.17 A). Die anschließende Transfektion des MART-1-YVL- bzw. des BZLF1-Expressionsplamids in DG75-Zellen erfolgte jeweils zusammen mit einem Minigen-Kontrollplasmid. Das mit MART-1-YVL koexprimierte

Minigen kodierte für das VQT-Epitop von BZLF1, und das mit BZLF1 koexprimierte Minigen für das YVL-Epitop von BRLF1. Peptide dieser kurzen Länge werden Proteasom-unabhängig auf MHC-Klasse-I präsentiert (Wolf und Princiotta, 2011). 24 h nach Kotransfektion wurden die Zellen für 6 h in An- oder Abwesenheit des Proteasom-Inhibitors MG132 weiterkultiviert, dann mit 0,25 % Paraformaldehyd fixiert und schließlich über Nacht mit BRLF1-YVL- oder BZLF1-VQT-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kokubiert. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen war in MG132-behandelten Zellen die Präsentation der Epitope aus den Vollängenproteinen deutlich reduziert, was auf eine entscheidende Rolle des Proteasoms in der Präsentation dieser Antigene auf MHC-Klasse-I hinwies. Dagegen war die Präsentation der Minigen-kodierten Epitope nicht durch die Inhibition des Proteasoms beeinträchtigt (Abb. 5.17 B). Durch die Minigen-Kontrollen wurden somit unspezifische, toxische Effekte des Proteasom-Inhibitors als Ursache für die verminderte Präsentation der Vollängenantigene ausgeschlossen.

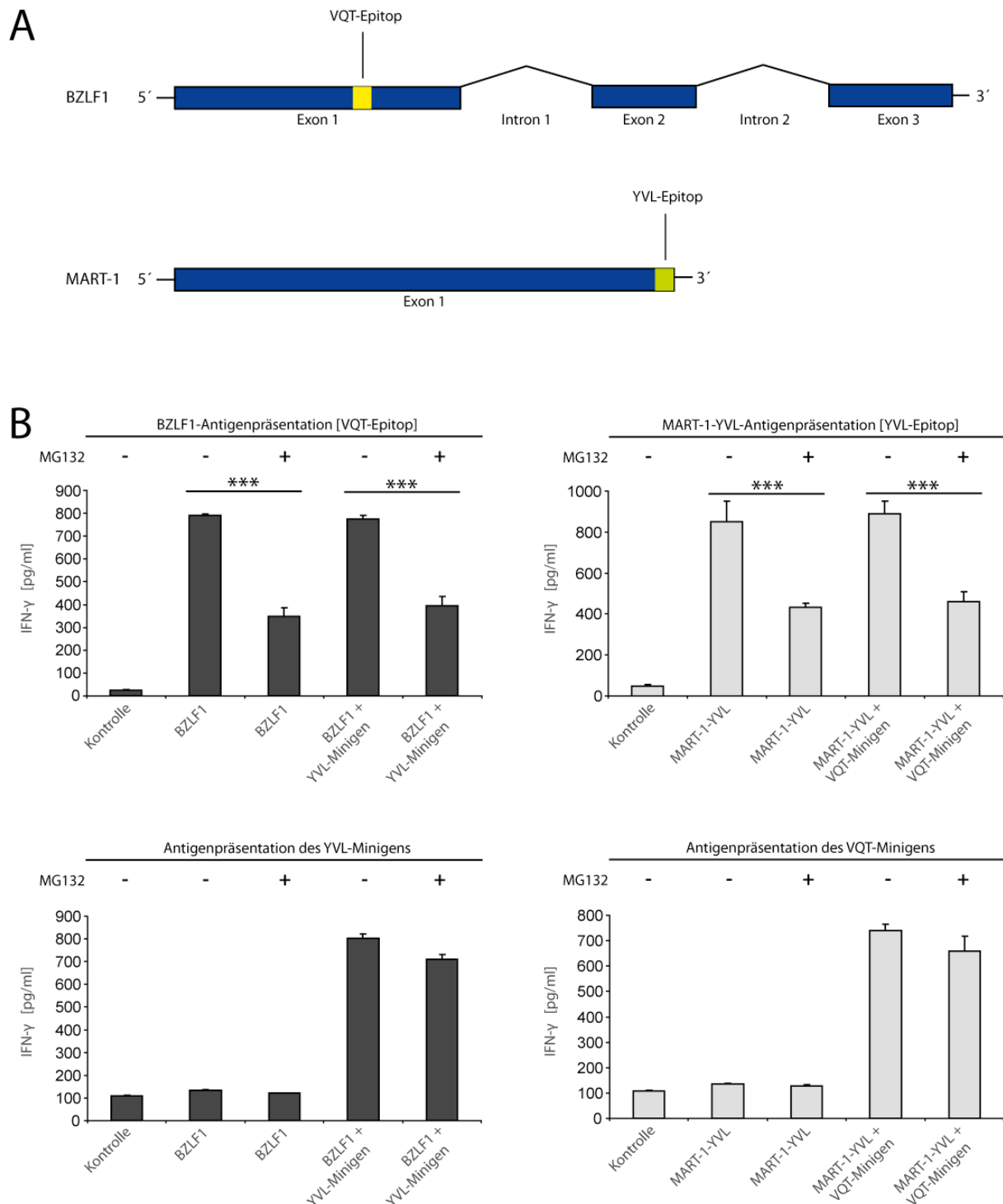


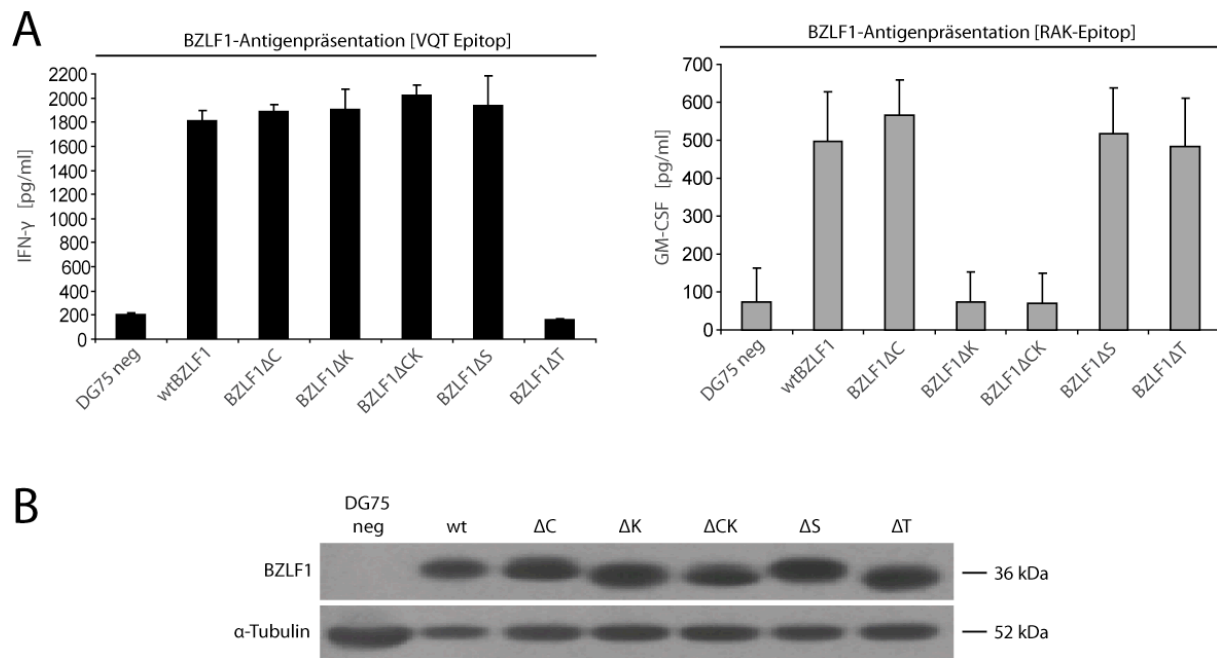
Abbildung 5.17: BZLF1- und MART-1-YVL werden Proteasom-abhängig präsentiert

(A) Schematische Darstellung der offenen Leserahmen von BZLF1 und MART-1-YVL. Durch Fusion des YVL-Epitops von BRLF1 an das C-terminale Ende von MART-1 konnte die Antigenpräsentation mit YVL-spezifischen T-Zellen getestet werden. **(B)** DG75-Zellen wurden mit BZLF1 oder MART-1-YVL kodierenden Expressionsplasmiden zusammen mit dem Restriktionsmolekül HLA-B*1501 kotransfiziert. Zudem wurden die Zellen mit Plasmiden kotransfiziert, die ein Minigen trugen. Das Minigen kodierte jeweils für ein Epitop, das nicht

im Vollängenprotein enthalten war (YVL im Falle von BZLF1 und VQT im Falle von MART-1-YVL). Die Transfektanten wurden am folgenden Tag in An- oder Abwesenheit von 10 μ M MG132 für 6 h kultiviert, danach mit 0,25 % Paraformaldehyd fixiert, anschließend entweder mit BRLF1-YVL- oder BZLF1-VQT-spezifischen T-Zellen kokultiviert und die Antigenerkennung mittels Zytokin-ELISA gemessen. Repräsentativ dargestellt ist jeweils eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifachbestimmungen im ELISA. Die statistische Signifikanz wurde durch Verwendung des ungepaarten *t*-Tests berechnet (**p-Wert < 0.01).

5.3.2 Die Mutation ubiquitinylierbarer Aminosäuren in den Antigenen beeinträchtigt nicht die Präsentation auf MHC-Klasse-I

Da Proteine, die dem proteasomalen Abbau zugeführt werden sollen, mit Ubiquitin markiert werden (Husnjak und Dikic, 2012), stellte sich angesichts der Bedeutung des proteasomalen Abbaus für die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation die Frage, ob die Generierung von Antigenen ebenfalls Ubiquitin-vermittelt erfolgt. In letzter Zeit mehren sich die Hinweise darauf, dass eine Ubiquitin-Konjugation nicht nur an Lysinen (K), sondern auch an den Aminosäuren Cystein (C), Serin (S) und Threonin (T) erfolgen kann (Shimizu et al., 2010). Aus diesem Grund wurden fünf BZLF1-Mutanten erstellt, in denen entweder alle K zu Argininen (R), beziehungsweise alle C, S oder T zu Alaninen (A) mutiert waren. Außerdem wurde eine Mutante generiert, in welcher sowohl alle K als auch alle C mutiert waren. Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden in DG75-Zellen transfiziert und die Transfektanten nach 24 h mit BZLF1-VQT- bzw. BZLF1-RAK-Epitop spezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. Abgesehen vom Verlust der T-Zellerkennung durch die Mutation von Aminosäuren in den T-Zell-Epitopen, wurden alle Mutanten ähnlich effizient von den T-Zellen erkannt (Abb. 5.18 A). In Western-Blot-Analysen wurden keine Unterschiede im Proteinexpressionsniveau festgestellt (Abb. 5.18 B). Deshalb deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die Prozessierung der Antigene entweder unabhängig von Ubiquitin erfolgte oder dass eine Konjugation mit Ubiquitin wahlweise an den verschiedenen Aminosäuren erfolgen konnte.



**Abbildung 5.18: Die Mutation von potentiell ubiquitinylierbaren Aminosäuren
beeinträchtigt nicht die Antigenpräsentation**

DG75-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Wildtyp-BZLF1 oder den Mutanten BZLF1ΔC, BZLF1ΔK, BZLF1ΔCK, BZLF1ΔS und BZLF1ΔT transfiziert. In diesen BZLF1-Mutanten waren die potentiell ubiquitinylierbaren Aminosäuren Cystein (ΔC), Serin (ΔS), Threonin (ΔT) sowie Cystein und Lysin (ΔCK) zu Alanin (A) bzw. Lysin (ΔK) zu Arginin (R) mutiert. Zudem wurden die Restriktionsmoleküle HLA-B*0801 und HLA-B*1501 kotransfiziert. **(A)** 24 h später wurden zu den Transfektanten BZLF1-VQT- oder BZLF1-RAK-spezifische T-Zellen zugegeben und die T-Zellerkennung mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Repräsentativ dargestellt ist jeweils eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifachbestimmungen im ELISA. **(B)** Die BZLF1-Proteinexpression der Transfektanten wurde mittels Western-Blot verglichen. Dazu wurde ein anti-His₆-Antikörper verwendet, der das His-Etikett am C-Terminus aller BZLF1-Varianten erkannte. Der Nachweis von α-Tubulin erfolgte durch einen anti-α-Tubulin-Antikörper und diente als Ladekontrolle.

5.3.3 Für die Antigenpräsentation sind keine ubiquitinylierbaren Aminosäuren im Antigen notwendig

Um zu überprüfen, ob eine Redundanz in der Verwendung der potentiellen Ubiquitinylierungsstellen existierte und ob für die Antigenpräsentation eine Mindestanzahl an ubiquitinylierbaren Aminosäuren erforderlich war, wurden weitere Mutanten generiert, in denen C, K, S und T in BZLF1 und MART-1 sukzessive zu A oder R mutiert wurden. Die Vollmutanten BZLF1- Δ CKST bzw. MART-1- Δ CKST enthielten keinerlei C, K, S oder T mehr. Überdies wurde das BRLF1-YVL-Epitop, das selbst keine ubiquitinylierbaren Aminosäuren enthielt, an die offenen Leserahmen dieser Mutanten fusioniert, um die mit den eingeführten Mutationen verbundene Zerstörung der T-Zell-Epitope zu kompensieren. Zudem wurde ein His₆-Etikett am C-Terminus angefügt, um die verschiedenen Proteine mit einem His₆-spezifischen Antikörper detektieren zu können (Abb. 5.19 A). Mit diesen Expressionsplasmiden wurden DG75-Zellen transfiziert und nach 24 h die YVL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zugegeben. Die T-Zellerkennung wurde durch die Mutationen nicht beeinflusst (Abb. 5.19 B). Zugleich konnten in der Untersuchung der Proteinmengen im Western-Blot keine signifikanten Unterschiede detektiert werden, was darauf hinwies, dass die veränderte Aminosäuresequenz nicht zu Einbußen in der Effizienz der Proteinsynthese geführt hatte (Abb. 5.19 C).

Um Sättigungseffekte durch hohe transfizierte DNA-Mengen bei den T-Zell-Analysen der Transfektanten auszuschließen, wurden DG75-Zellen in zusätzlichen Experimenten mit steigenden Mengen des Wildtyp-BZLF1-, oder des BZLF1- Δ CKST-Expressionsplasmids transfiziert. Dabei zeigte sich eine DNA-konzentrationsabhängige ähnliche T-Zellerkennung beider Transfektanten, was für eine gleichermaßen effiziente Antigengenerierung in beiden Transfektanten und gegen Sättigungseffekte sprach (Abb. 5.19 D).

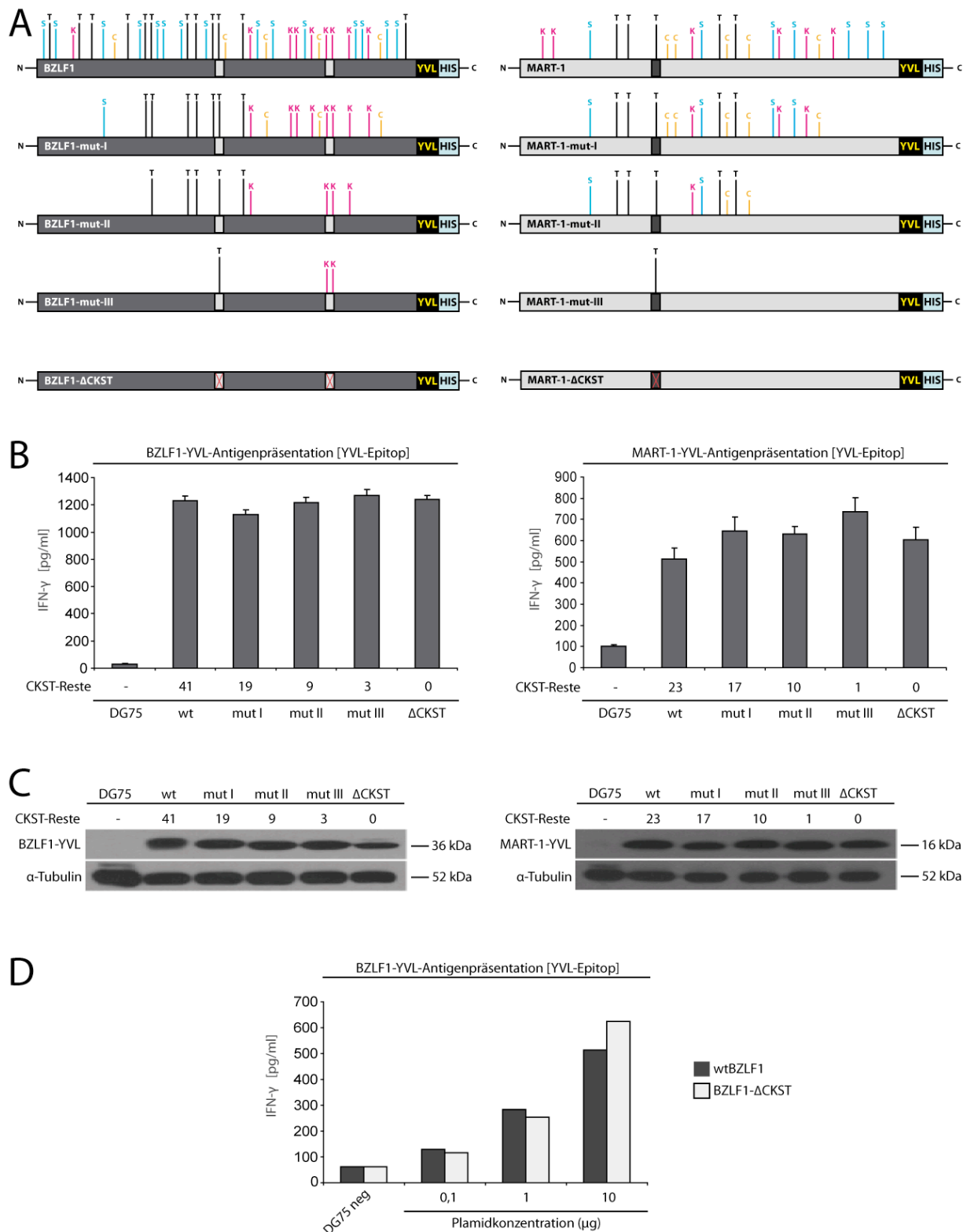


Abbildung 5.19: Das Fehlen ubiquitylierbarer Aminosäuren in BZLF1 und MART-1 beeinträchtigt nicht die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation

(A) Schematische Darstellung der generierten BZLF1- und MART-1-Mutanten. Gezeigt sind die Positionen aller Cysteine (C), Lysine (K), Serine (S) und Threonine (T) in BZLF1 und MART-1, die in jeweils vier Schritten komplett zu Alanin (A), bzw. im Fall von K zu Arginin (R) mutiert

wurden. Die offenen Leserahmen aller BZLF1- und MART-1-Varianten wurden C-terminal mit dem BRLF1-YVL-Epitop fusioniert und mit einem His₆-Etikett versehen. **(B)** DG75-Zellen wurden mit den BZLF1- oder MART-1-Expressionsplasmiden transfiziert, nach 24 h mit den YVL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert und die Antigenerkennung mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifachbestimmungen im ELISA. **(C)** Nach Herstellung von Zelllysaten der transfizierten Zellen wurde die Expression der verschiedenen Proteine mit Hilfe eines anti-His₆-Antikörpers im Western-Blot untersucht. α -Tubulin fungierte als Ladekontrolle. **(D)** DG75-Zellen wurden mit steigenden Mengen an BZLF1- bzw. BZLF1- Δ CKST-Expressionsplasmid transfiziert. Nach Kokultur mit YVL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde die T-Zellerkennung mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Repräsentativ dargestellt ist jeweils eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

5.3.4 Massenspektrometrische Analysen lieferten keinen Hinweis auf eine N-terminale Ubiquitylierung von BZLF1

Zusätzlich zu den beschriebenen Aminosäuren innerhalb eines Proteins kann eine Ubiquitin-Konjugation auch am N-Terminus von Proteinen erfolgen (Ciechanover und Ben-Saadon, 2004). Um zu untersuchen, ob möglicherweise die N-terminale Ubiquitylierung für die Antigenprozessierung von Bedeutung war, sollte eine massenspektrometrische Charakterisierung des Ubiquitylierungs-Status von Wildtyp-BZLF1 sowie, als Kontrolle, für interne Ubiquitylierungen der BZLF1- Δ CKST-Mutante unternommen werden. Um mögliche Ubiquitin-Konjugate anzureichern, wurden die rekombinanten Proteine mit C-terminalem His₆-Etikett in HEK293T-Zellen in Anwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG132 exprimiert und mit Hilfe von Nickel-NTA-*beads* aufgereinigt. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine mit einer Coomassie-Lösung angefärbt, die Banden der entsprechenden Größen aus dem Gel ausgeschnitten und die Exzidate massenspektrometrisch analysiert. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Juliane Merl der Technologieplattform *Proteomics* des Helmholtz Zentrum München durchgeführt.

Erwartungsgemäß wurden bei Wildtyp-BZLF1, nicht aber bei der Vollmutante, Ubiquitin-Konjugationen innerhalb des Proteins detektiert. Eine N-terminale Ubiquitylierung wurde jedoch bei keinem der untersuchten Proteine gefunden. Zusammenfassend zeigten diese

Ergebnisse, dass die BZLF1- Δ CKST-Mutante keine Ubiquitin-Konjugationen aufwies und somit ihre Präsentation auf MHC-Klasse-I unabhängig von einer direkten Ubiquitinylierung des Substratproteins erfolgte (Abb. 5.20).

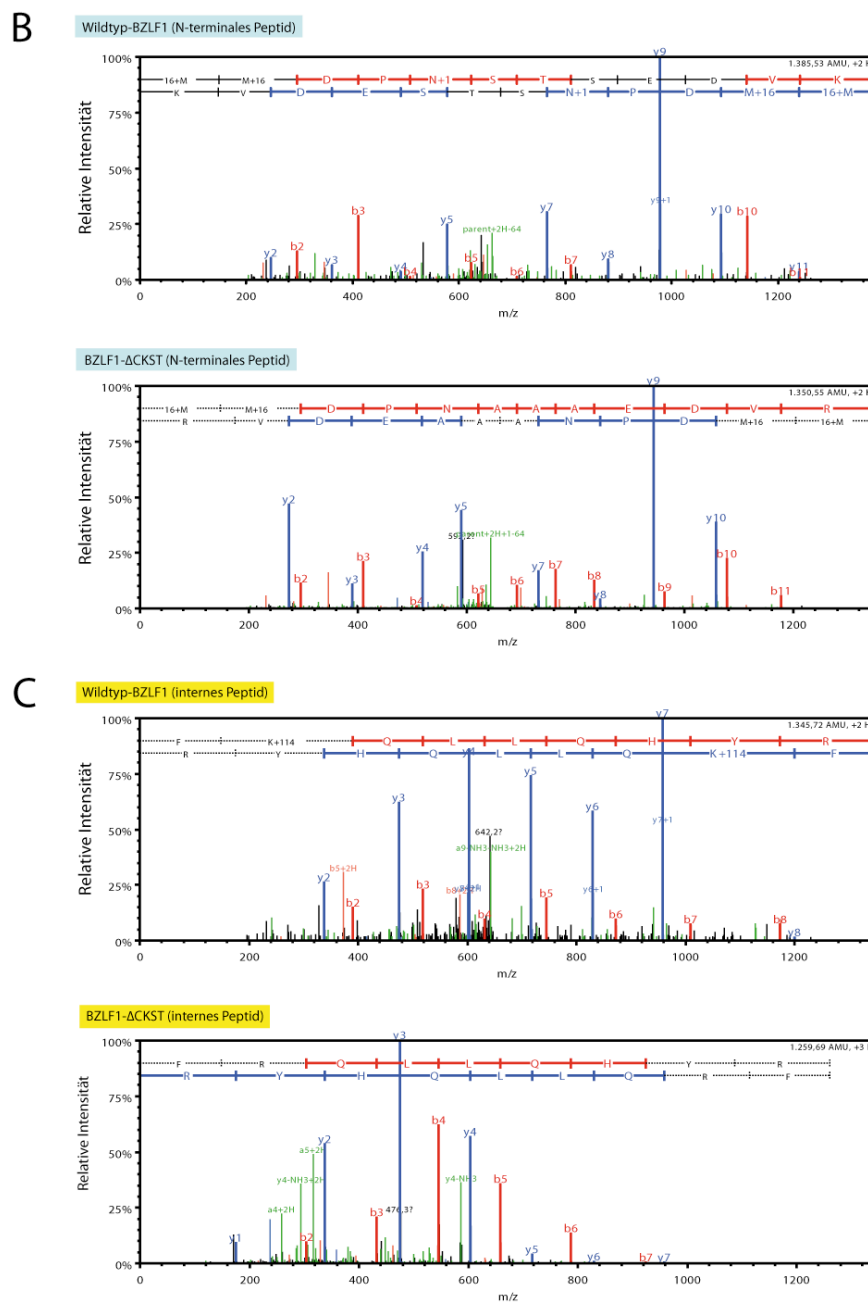


Abbildung 5.20: Massenspektrometrische Analyse von Wildtyp-BZLF1 und BZLF1-ΔCKST

HEK293T-Zellen wurden entweder mit Wildtyp-BZLF1- oder BZLF1-ΔCKST-Expressionsplasmid transfiziert. 42 h nach Transfektion wurde der Proteasom-Inhibitor MG132 zugesetzt und die Zellen für weitere 6 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Harnstoff-Lysepuffer, der ebenfalls mit MG132 versetzt war, lysiert, und die BZLF1-Proteine über deren C-terminales His₆-Etikett mit Nickel-NTA-*beads* isoliert. Die Proteine wurden elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, im Gel anschließend mit Coomassie-Lösung angefärbt und die Proteinbanden der entsprechenden Größe ausgeschnitten. Die eluierten Proteine wurden massenspektrometrisch sowohl auf interne als auch auf N-terminale Ubiquitin-Modifikationen hin analysiert. **(A)** Aminosäuresequenz von Wildtyp-BZLF1 und BZLF1-ΔCKST. Die massenspektrometrisch analysierten N-terminalen bzw. internen Peptide sind farblich gekennzeichnet (blau bzw. gelb). **(B)** Massenspektrogramm der analysierten N-terminalen Peptide beider BZLF1-Proteine. **(C)** Massenspektrogramm jeweils eines repräsentativen internen Peptids beider BZLF1-Proteine. Die Ubiquitinylierung des im Wildtyp-BZLF1 vorhandenen Lysins konnte im entsprechenden Peptid der Vollmutante wegen dessen Mutation in ein Arginin nicht detektiert werden.

5.3.5 Expression von BZLF1 im Endoplasmatischen Retikulum über eine Fusion mit der Signalsequenz von Apolipoprotein B

Während die eigenen Ergebnisse keinen Hinweis auf eine essentielle Rolle der Ubiquitinylierung bei der Präsentation von zytoplasmatischen Antigenen auf MHC-Klasse-I lieferten, wurde kürzlich beschrieben, dass die Präsentation von Antigenen, die primär im ER lokalisiert sind mit deren Ubiquitinylierung durch die E3-Ubiquitin-Ligase HRD1 korrelierte (Huang et al., 2011). Proteine im ER, die beispielsweise aufgrund unkorrekter Faltung dem ERAD-Qualitätskontroll-Mechanismus (*endoplasmic reticulum associated degradation*; ERAD) unterliegen, werden ins Zytoplasma retransloziert (Hirsch et al., 2009; Kikkert et al., 2004; Rubenstein et al., 2012; Vembar und Brodsky, 2008). HRD1 ubiquitinyliert die entsprechenden Substratproteine während des Retranslokationsprozesses und führt sie dadurch dem sofortigen proteasomalen Abbau zu. Sollte die HRD1-vermittelte Ubiquitinylierung eine Voraussetzung für die Präsentation von ER-Antigenen darstellen, so würde dies auf unterschiedliche Präsentationswege für Antigene in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten hinweisen.

Um den Beitrag der HRD1-vermittelten Ubiquitylierung auf die Prozessierung von ER-Antigenen zu untersuchen, wurden sowohl Wildtyp-BZLF1 als auch die Vollmutante BZLF1- Δ CKST N-terminal mit einer Signalsequenz versehen, welche eine Translation ins ER vermittelte. Die Signalsequenz von Apolipoprotein B (ApoB) wurde ausgewählt, weil sie keinerlei C, K, S oder T enthielt und somit keine Konjugationsstellen für Ubiquitin aufwies. Um die subzelluläre Lokalisation der rekombinanten Proteine im ER zu überprüfen, wurden C-terminale Fusionen mit GFP erstellt. Die entsprechenden Expressionsvektoren wurden in HEK293T-Zellen transfiziert, und die Lokalisation der Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie anhand der GFP-Expression bestimmt. Als Kontrolle wurde ein ER-dsRED-Expressionsplasmid kotransfiziert, das anstelle der ER-Signalsequenz des ApoB für die ER-Signalsequenz von Immunglobulin G (IgG), und anstelle des GFP für das rot fluoreszierende Protein (dsRED) kodierte. Das ER-dsRED-Plasmid basierte auf einem kommerziell erhältlichen Vektor zur Targetierung des ER. Durch Detektion der Fluoreszenzsignale und deren Überlagerung konnte bestätigt werden, dass die GFP-gekoppelten ApoB-Fusionsproteine, ebenso wie das dsRED-Kontrollprotein, ER-lokalisiert und somit im ER exprimiert worden waren (Abb. 5.21).

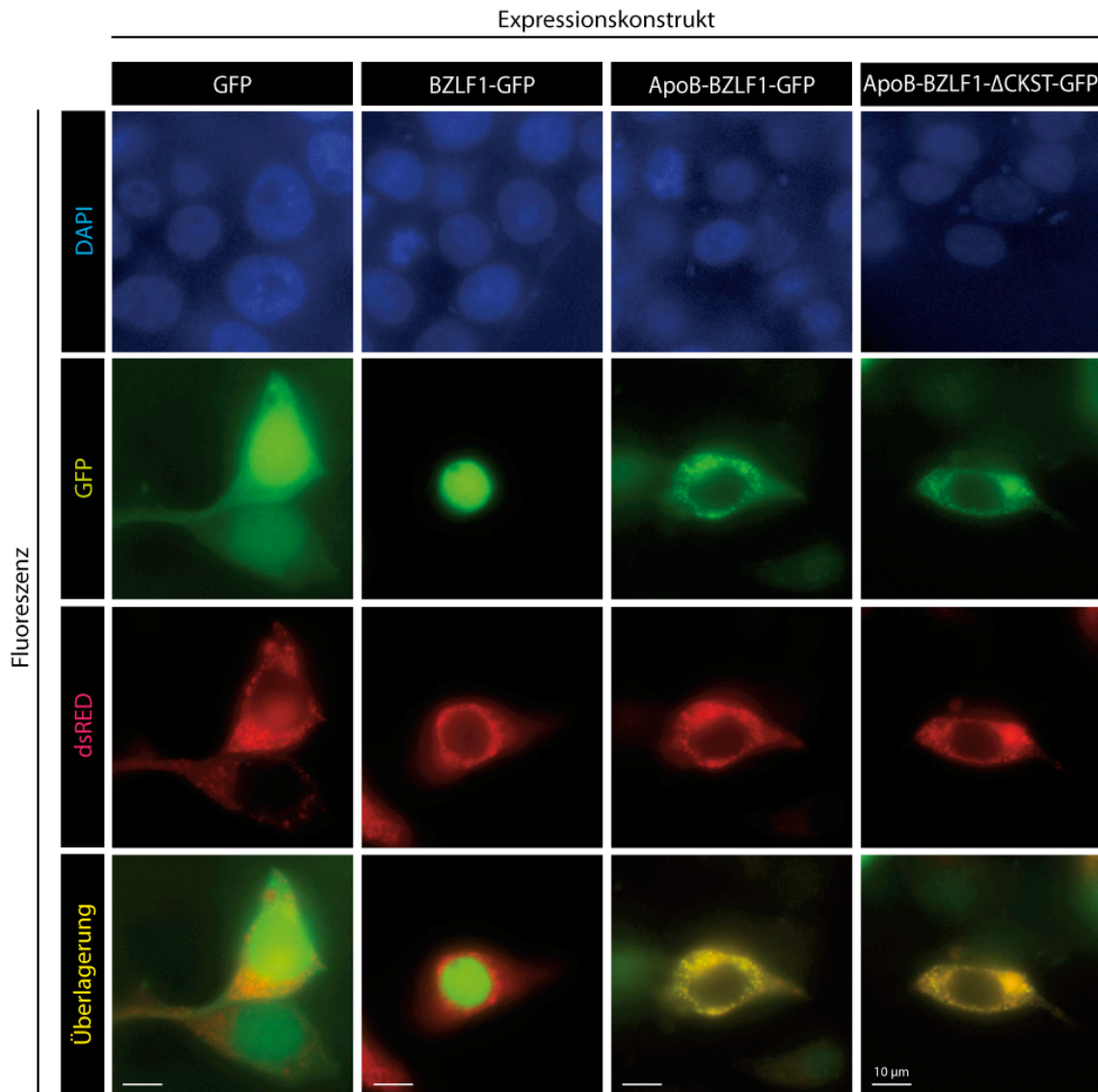


Abbildung 5.21: Die ApoB-Signalsequenz vermittelte eine Lokalisation der BZLF1-Fusionsproteine im Endoplasmatischen Retikulum

HEK293T-Zellen wurden mit dem ER-dsRED-Plasmid sowie entweder mit dem Expressionsvektor für GFP (links), BZLF1-GFP (zweites von links), ApoB-BZLF1-GFP (zweites von rechts) oder ApoB-BZLF1-ΔCKST-GFP (rechts) kotransfiziert und die subzelluläre Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei dienten die Expressionsplasmide für GFP (Zytoplasma und Nukleus), BZLF1-GFP (Nukleus) und ER-dsRED (Endoplasmatisches Retikulum, ER) als Kontrollen für unterschiedliche subzelluläre Kompartimente. Durch Überlagerung der Grünfluoreszenz der ApoB-GFP-Fusionsproteine mit der Rotfluoreszenz der ER-dsRED-Kontrollproteine konnte eine Kolo-kalisation im ER nachgewiesen werden. (Die Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation wurde freundlicherweise durchgeführt von Dr. Rainer Kaufmann; Micron Advanced Bioimaging Unit; University of Oxford).

5.3.6 Die HRD1-vermittelte Ubiquitinylierung ist erforderlich für den Proteinabbau, nicht jedoch für die Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I

Um die vorbeschriebene Rolle der HRD1-vermittelten Ubiquitinylierung auf den proteasomalen Abbau von ERAD-Substraten zu dokumentieren, wurden DG75-Zellen mit Expressionsplasmiden für die ER-Antigene ApoB-BZLF1 oder ApoB-BZLF1- Δ CKST mit Expressionsplasmiden für Wildtyp-HRD1 oder dessen dominant-negativer Variante dnHRD1 (Nadav et al., 2003) bzw. Leervektor kotransfiziert. Am nächsten Tag wurde die BZLF1-Proteinexpression mittels Western-Blot untersucht. Während ApoB-BZLF1 bei Koexpression von dnHRD1 deutlich akkumulierte, wurde dieser Effekt bei der nicht ubiquitinylierbaren Mutante ApoB-BZLF1- Δ CKST nicht beobachtet. Eine vermehrte Verfügbarkeit von Wildtyp-HRD1 hatte auf keine der beiden BZLF1-Proteine einen wesentlichen Effekt. Der stabilisierende Effekt von dnHRD1 bzw. der neutrale Effekt von Wildtyp-HRD1 auf ApoB-BZLF1-GFP wurde auch beobachtet, wenn das Expressionsniveau über die GFP-Fluoreszenz durchflusszytometrisch analysiert wurde. Die mittlere Fluoreszenzintensität war bei Koexpression von dnHRD1 deutlich höher als bei Koexpression von Wildtyp-HRD1. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass das artifizielle ER-Protein ApoB-BZLF1 ein ERAD-Substrat darstellte, welches durch HRD1 ubiquitinyliert und, vermutlich nach Retranslokation ins Zytoplasma, proteasomal degradiert wurde (Abb. 5.22 A und B). Um den Beitrag der Ubiquitinylierung zur MHC-Klasse-I-restringierten Präsentation von ER-lokalisiertem BZLF1-YVL-Fusionsprotein zu untersuchen, wurden die transient transfizierten Zellen mit YVL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. Die YVL-Fusionsproteine ApoB-BZLF1 und ApoB-BZLF1- Δ CKST wurden gleichermaßen effizient von den YVL-spezifischen T-Zellen erkannt. Bemerkenswerterweise wurde die T-Zellerkennung jedoch im Falle beider Fusionsproteine weder durch koexprimiertes Wildtyp-HRD1, noch durch koexprimiertes dnHRD1 gestört (Abb. 5.22 C).

Die HRD1-vermittelte Ubiquitinylierung hatte somit zwar Einfluss auf die Stabilität ER-lokalisierter Proteine, nicht aber auf deren MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation an CD8⁺ T-Zellen.

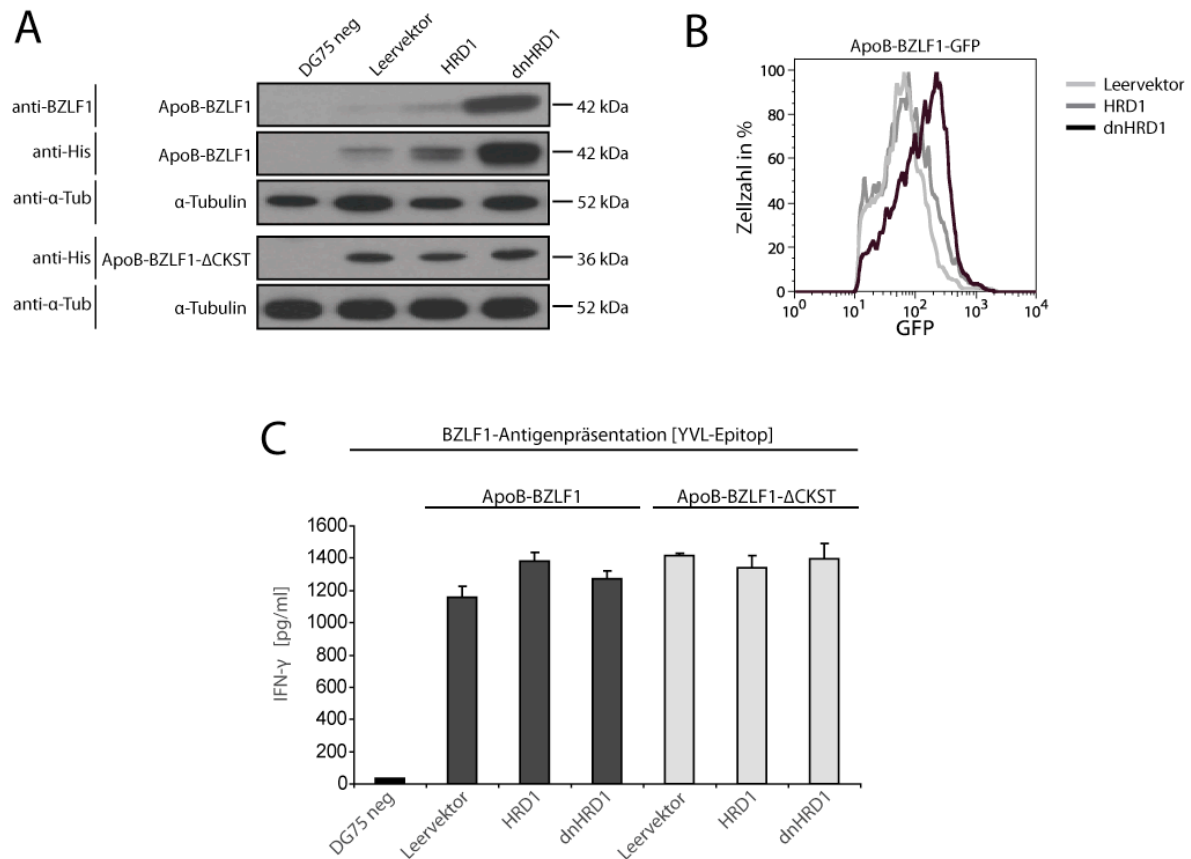


Abbildung 5.22: Die Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I erfolgt unabhängig von einer HRD1-vermittelten Ubiquitinylierung der ER-Proteine

DG75-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für YVL-His₆-gekoppeltes ApoB-BZLF1 oder ApoB-BZLF1-ΔCKST transfiziert und mit Leervektor, Wildtyp-HRD1-, oder dnHRD1-Expressionsplasmiden kotransfiziert. **(A)** 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Proteinexpression mittels Western-Blot analysiert. Durch Einsatz eines His₆-spezifischen Antikörpers konnten die His₆-Etikett-tragenden BZLF1-Proteine detektiert werden. Zum Nachweis von Wildtyp-BZLF1 wurde alternativ ein BZLF1-spezifischer Antikörper eingesetzt. Das *housekeeping*-Protein α-Tubulin fungierte als Ladekontrolle. **(B)** DG75-Zellen wurden mit dem ApoB-BZLF1-GFP Expressionsplasmid und Leervektor, HRD1- oder dnHRD1-Expressionsplasmid kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurde die GFP-Fluoreszenzintensität der transfizierten Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Gezeigt ist ausschließlich die Fluoreszenzintensität der GFP-positiven Zellen, da nicht die gesamte Zellpopulation transfiziert worden war. **(C)** Die in (A) beschriebenen Zellen wurden mit YVL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert, und die T-Zellerkennung der YVL-etikettierten rekombinanten Proteine mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten ist jeweils repräsentativ gezeigt. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifachbestimmungen im ELISA.

5.3.7 Eine Inhibition der Poly-Ubiquitinylierung durch Mutation von Lysin48 im Ubiquitin führt zu einer verminderten Antigenpräsentation

Die eigenen Ergebnisse zum fehlenden Einfluss der Ubiquitinylierung auf die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation standen auf den ersten Blick in Widerspruch zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Ebstein et al., 2012; Huang et al., 2011). In der eigenen Arbeit war allerdings bislang nur der Einfluss von Mutationen der Ubiquitinylierungsstellen im Substratprotein (Kapitel 5.3.3) und der Einfluss der HRD1-vermittelten Ubiquitinylierung (Kapitel 5.3.6) auf die Antigenpräsentation untersucht worden. In den publizierten Arbeiten waren dagegen Mutanten von Ubiquitin selbst verwendet worden. Diese Ubiquitin-Mutanten enthielten keine Lysine mehr und konnten deshalb keine Ubiquitinketten mehr bilden. Damit wurden alle zellulären Prozesse unterdrückt, die eine Poly-Ubiquitinylierung erforderten.

Im Folgenden sollte deshalb geprüft werden, ob eine Inhibition der Poly-Ubiquitinylierung auch die Präsentation der eigenen Modellantigene unterdrückte. Dazu wurden Expressionsplasmide für Wildtyp-Ubiquitin sowie für zwei verschiedene Ubiquitin-Mutanten konstruiert, in denen entweder das K an Position 33 (Ub-K33R) oder das K an Position 48 (Ub-K48R) durch R ersetzt worden war. Das K48 im Ubiquitin gilt als essentiell für die Bildung von mehrgliedrigen Ubiquitinketten (Poly-Ubiquitine) und für den Poly-Ubiquitin-vermittelten proteosomalen Abbau von Substratproteinen. In diesen Kettenmolekülen sind die einzelnen Ubiquitin-Moleküle über eine Bindung ihres K48 an das C-terminale Glycin (G) des benachbarten Ubiquitins miteinander verknüpft (Mallette und Richard, 2012; Marx et al., 2010; Pickart, 1997). Die Expression der Ub-K48R-Mutante sollte somit eine K48-verknüpfte Poly-Ubiquitinylierung wie auch den proteosomalen Proteinabbau verhindern und, im Falle eines Einflusses der Poly-Ubiquitinylierung auf die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation, diese hemmen. K33 kann ebenfalls zur Bildung von Poly-Ubiquitinketten genutzt werden, allerdings wurde die Poly-Ubiquitinylierung über K33 bislang nicht mit dem proteosomalen Proteinabbau oder der Antigenprozessierung in Zusammenhang gebracht; sie spielt möglicherweise eine Rolle bei der Modifikation von Kinasen (Huang et al., 2010). Die Mutante Ub-K33R diente daher als Kontrolle.

Die Expressionsplasmide für die verschiedenen Ubiquitin-Proteine wurden transient in DG75-Zellen transfiziert. Im Gegensatz zu den bisherigen Experimenten, die auf einer einmaligen Transfektion beruhten, wurden die Zellen in diesem Fall zweimal elektroporiert.

Bei der ersten Transfektion wurden lediglich die Ubiquitin-Expressionsplasmide verwendet, bevor am folgenden Tag das Wildtyp-BZLF1- oder das BZLF1- Δ CKST-Expressionsplasmid zusammen mit der jeweiligen Ubiquitin-Variante kotransfiziert wurde. Dadurch sollte ein möglichst hohes Expressionsniveau der eingebrachten Ubiquitin-Proteine erreicht und somit die Konkurrenz mit endogenem Wildtyp-Ubiquitin um Substrat zugunsten der Ubiquitin-Mutanten verschoben werden. Weitere 24 h später wurden die Zellen mit antigenspezifischen T-Zellen kokultiviert und die T-Zellaktivierung mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Die Koexpression der Ub-K48R-Mutante führte im Vergleich zu Wildtyp-Ubiquitin oder Ub-K33R-Mutante zu einer deutlich verminderten T-Zellerkennung sowohl von Wildtyp-BZLF1 als auch von BZLF1- Δ CKST. Um unspezifische Effekte der Ub-K48R-Mutante auszuschließen, wurden die verwendeten DG75-Zellen zusätzlich mit einem Expressionsplasmid für das YVL-Epitop kotransfiziert. Die Erkennung dieser transfizierten Zellen durch YVL-spezifische T-Zellen war durch die Expression der Ub-K48R-Mutante nicht beeinträchtigt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die K48-verknüpfte, nicht aber die K33-verknüpfte Poly-Ubiquitinylierung für eine effiziente Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I notwendig ist.

In Zusammenschau aller Ergebnisse zur Ubiquitinylierung kann demnach postuliert werden, dass die Ubiquitinylierung des Antigenmoleküls zwar den proteasomalen Proteinabbau vermittelt, nicht aber die Präsentation des Antigens auf MHC-Klasse-I beeinflusst. Dagegen hat die Generierung von Poly-Ubiquitinketten über K48 durchaus einen Einfluss auf beide Prozesse. Allerdings findet die Poly-Ubiquitinylierung, die offensichtlich für die Antigengenerierung relevant ist, nicht am Antigen selbst, sondern an anderen für die Antigenpräsentation relevanten Proteinen statt.

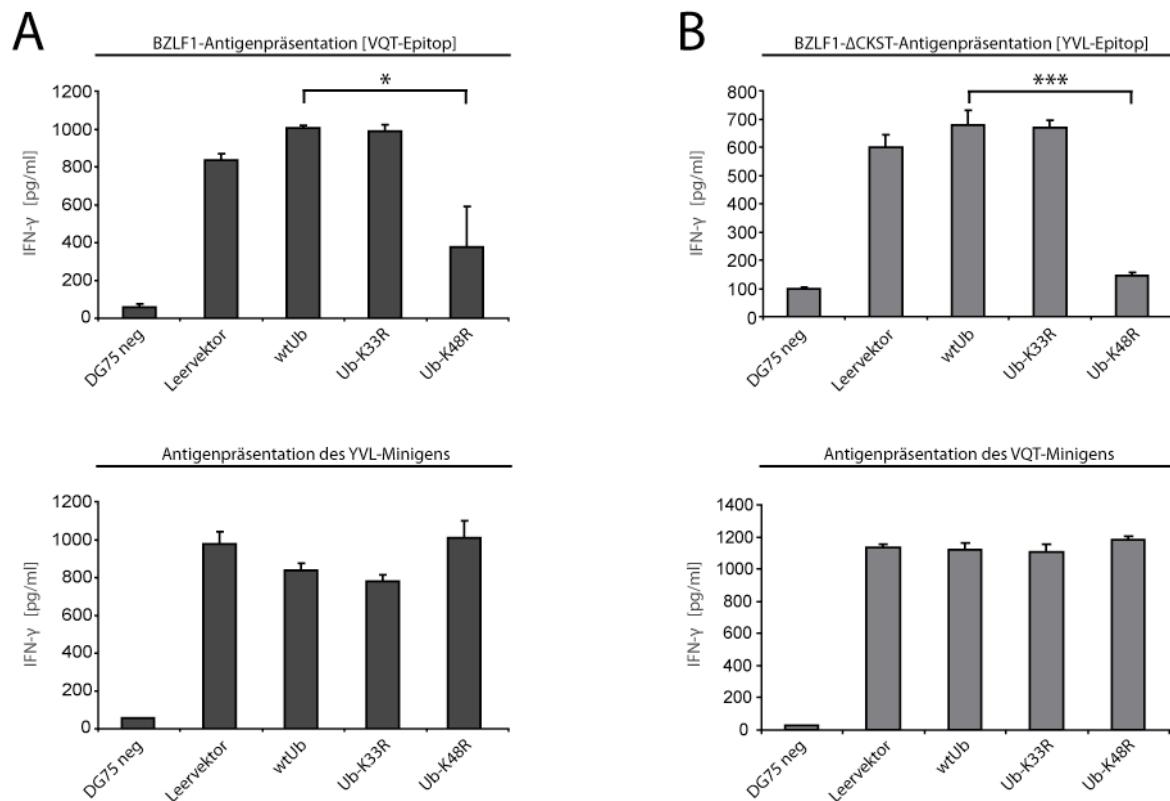


Abbildung 5.23: Die Ubiquitin-Mutante Ub-K48R inhibiert die MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation von BZLF1

DG75-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für Wildtyp-Ubiquitin (wtUb), Ub-K33R oder Ub-K48R transient transfiziert. 24 h später wurden die Zellen erneut mit dem jeweiligen Ubiquitin-Plasmid sowie Expressionsplasmiden für BZLF1 bzw. BZLF1-ΔCKST und dem YVL-Epitop bzw. VQT-Epitop (Minigen) kotransfiziert. Des Weiteren wurden alle Zellen zusätzlich mit dem Restriktionsmolekül HLA-B*1501 kotransfiziert. Weitere 24 h nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen entweder mit YVL- oder VQT-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert und die Erkennung von Antigenen bzw. von Minigen-kodiertem Epitop im Zytokin-ELISA bestimmt. Eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten ist jeweils repräsentativ dargestellt. Die Standardabweichungen ergaben sich aus Dreifachbestimmungen im ELISA. Statistische Signifikanz wurde durch Verwendung des ungepaarten *t*-Tests berechnet (**p*-Wert < 0.01; ****p*-Wert < 0.001). **(A)** Präsentation von Wildtyp-BZLF1 mit VQT-spezifischen T-Zellen (oben) bzw. des kotransfizierten, Minigen-kodierten YVL-Epitops mit YVL-spezifischen T-Zellen (unten). **(B)** Präsentation der YVL-etikettierten Vollmutante BZLF1-ΔCKST mit YVL-spezifischen T-Zellen (oben) bzw. des kotransfizierten, Minigen-kodierten VQT-Epitops mit VQT-spezifischen T-Zellen (unten).

6. Diskussion

Die Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen ist von entscheidender Bedeutung für die Erkennung und Bekämpfung von Tumoren und Virusinfektionen (Apcher et al., 2009; Snyder et al., 2003). Obwohl die mechanistischen Grundlagen großteils aufgeklärt wurden, sind wichtige Aspekte und Details des MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationswegs noch unverstanden (Hansen und Bouvier, 2009). So gelten zwar DRiPs als Hauptantigenquelle, allerdings ist noch unklar, ob bzw. in welchem Ausmaß auch mature Proteine zum Antigenpool beitragen (Yewdell und Nicchitta, 2006; Yewdell et al., 2003). Obwohl eine enge Kopplung von Antigenpräsentation und -translation als gesichert gilt, ist noch ungeklärt, inwieweit Eigenschaften und Charakteristika der Antigen-mRNA diesen Prozess beeinflussen. Offene Fragen bestehen auch hinsichtlich der Antigenprozessierung. Zwar werden fast alle bislang untersuchten Antigene durch das Proteasom generiert; wie sie für den proteasomalen Abbau markiert und dem Proteasom zugeführt werden, ist aber ebenfalls noch unklar (Qian et al., 2006b; Yewdell, 2002). Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb eine genauere Charakterisierung der MHC-Klasse-I-Antigengenerierung.

6.1 Mature Proteine dienen nicht als Substrat für die Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I

Die Modulation der Stabilität viraler Modellproteine

Für eine Untersuchung des Beitrags maturer Proteine zur Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I wurde nach Proteinen gesucht, deren Stabilität mit Hilfe des ProteoTuner Systems moduliert werden konnte. Zudem kamen nur solche Proteine in Frage, gegen die spezifische CD8⁺ T-Zellen zur Verfügung standen. Dabei handelte es sich um die viralen Kandidatenproteine BRLF1 und EBNA1 sowie die Mutante EBNA1ΔGA, die durch die Deletion des internen *GA-repeats* (GA_r) generiert wurde. Diese, aus einer Abfolge von mehr als 200

Glycinen (G) und Alaninen (A) bestehende Sequenz, nimmt eine aus β -Faltblattstrukturen bestehende Konformation an, welche vermutlich den proteasomalen Abbau von EBNA1 inhibiert (Daskalogianni et al., 2008).

Während BRLF1 und EBNA1 Δ GA durch die Fusion mit der FKBP-L106P-Domäne effizient destabilisiert und durch Verwendung des synthetischen Liganden Shield1 dieser Instabilität erfolgreich entgegengewirkt werden konnte, war die Stabilität von EBNA1 nicht modulierbar. Somit ließen sich neben den bereits beschriebenen Modellproteinen wie dem gelbfluoreszierenden Protein YFP (*yellow fluorescent protein*; YFP) (Banaszynski et al., 2006), auch ausgewählte virale Proteine in ihrer Stabilität durch DD und Shield1 modulieren.

Mature Proteine tragen nicht zur Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I bei

Momentan geht man davon aus, dass hauptsächlich DRiPs, neusynthetisierte Polypeptide mit äußerst kurzer Halbwertszeit, als Substrate für die Antigenpräsentation fungieren. Dadurch wird eine rasche Präsentation von Antigenen unabhängig von der Stabilität des maturen Proteins gewährleistet (Yewdell et al., 1996). Aber auch mature Proteine selbst scheinen in den Antigenpräsentationsweg auf MHC-Klasse-I einzumünden. So wurden Peptide aus MHC-Klasse-I-Molekülen eluiert, die sekundäre Modifikationen trugen (Engelhard et al., 2006). Dabei handelte es sich u. a. um Glykosyl- und Phosphatgruppen, welche vermutlich erst nach Erreichen der nativen Konformation an das jeweilige Protein angefügt wurden, denn eine posttranslationale Modifikation von bereits degradierten Peptidfragmenten ist zwar theoretisch denkbar, konnte bislang aber nicht nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde kürzlich mit Hilfe von selbst-spleißenden Proteinen gezeigt, dass Antigene, welche ausschließlich durch Proteinspleißen entstehen, ebenfalls auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (Farfan-Arribas et al., 2012). Da diese Form der Proteinprozessierung ebenfalls nur nach Erreichen der nativen Konformation erfolgen kann, mussten die präsentierten Peptide von maturen Proteinen abstammen. Diese wurden ähnlich effizient auf MHC-Klasse-I präsentiert wie Epitope, die nur in ungespleißten Polypeptiden vorhanden sind und somit wahrscheinlich der DRiP-Fraktion angehörten.

In den eigenen Untersuchungen konnte kein signifikanter Beitrag maturer Proteine zur Antigenpräsentation nachgewiesen werden. Zumindest lag der Beitrag maturer Proteine

unter der Detektionsgrenze, was deren immunologische Relevanz zumindest in Frage stellt. Dagegen führte in Untersuchungen von Dolan und Kollegen (Dolan et al., 2011b) der induzierte, proteasomale Abbau einer durch Shield1 angereicherten Fraktion maturer Proteine zu einem leichten Anstieg der Antigenpräsentation (Dolan et al., 2011b; Dolan et al., 2012). Der Beitrag maturer Proteine zur Antigenpräsentation war zwar deutlich niedriger als der von DRiPs, dennoch stellte sich dadurch die Frage, worauf diese unterschiedlichen Ergebnisse zurückzuführen sind. Möglicherweise resultieren diese aus einer unterschiedlich hohen Antigenexpression oder aus unterschiedlichen experimentellen Herangehensweisen. So wurde in den eigenen Untersuchungen ein konditionales Expressionssystem verwendet, das eine Abschaltung der Antigentranskription und somit eine Untersuchung der Antigenpräsentation unabhängig von der Antigensynthese gestattete. Dagegen wurde bei Dolan und Kollegen die Antigentranskription von einem konstitutiv aktiven Promotor getrieben und eine Präsentation neu synthetisierten Antigens durch Verwendung des Translations-Inhibitors CHX verhindert (Dolan et al., 2011b; Dolan et al., 2012). Cycloheximid inhibiert allerdings nicht nur die Synthese von Antigen, sondern auch von Proteinen, die an der Antigenpräsentation beteiligt sind, wie z. B. MHC-Moleküle. Darüber hinaus werden durch die CHX-Behandlung auch Gene induziert (Ishihara et al., 1984; Maroteaux et al., 1983). Inwiefern diese Effekte zu den unterschiedlichen Ergebnissen in der Antigenpräsentation beitragen, ist noch ungeklärt. Zudem besteht die Möglichkeit, dass unterschiedliche Antigene durch unterschiedliche Mechanismen und Prozessierungswege generiert und präsentiert werden. Dies könnte auch die aufgezeigten Unterschiede des Beitrags maturer Proteine zur MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation erklären.

In welchem Ausmaß DRiPs versus mature Proteine zur Antigenpräsentation beitragen, kann somit noch nicht abschließend bewertet werden. Die Beantwortung dieser Frage besitzt aber nicht nur immunologische, sondern auch therapeutische Relevanz. So zielen einige immuntherapeutische Ansätze auf eine gezielte Targetierung von Genen ab, die in Tumoren überexprimiert sind. Im Falle des Tumorsuppressors p53 führen manche tumorspezifischen Mutationen zu einer verlängerten Halbwertszeit und damit zu einer Akkumulation des Proteins in den Tumorzellen (Brosh und Rotter, 2009). Durch die Gabe chemischer Inhibitoren kann mutiertes p53 destabilisiert und dem proteasomalen Abbau zugeführt werden (Wang et al., 2011). Würde dieser induzierte Abbau von maturem, mutierten p53 in Tumorzellen in einer verstärkten Präsentation von p53-Peptiden auf MHC-Klasse-I

resultieren, so könnte durch die gleichzeitige Gabe von p53-spezifischen CD8⁺ T-Zellen eine präferentielle Erkennung und Zerstörung von Tumorzellen erreicht werden (Vermeij et al., 2011).

Der GA-repeat verhindert nicht die Präsentation von EBNA1 auf MHC-Klasse-I

Für einen bedeutenden Beitrag maturer Proteine zum Antigenpool könnte auch die Tatsache gewertet werden, dass manche viralen Proteine sich einem proteasomalen Abbau entziehen. Dazu zählen beispielsweise das LANA-1-Protein des Humanen Herpesvirus 8 oder EBNA1 des EBV (Dantuma et al., 2002; Kwun et al., 2011; Kwun et al., 2007). In EBNA1 ist hierfür der GAR verantwortlich. Zudem inhibiert die für den GAR kodierende RNA-Sequenz die eigene Translation (Tellam et al., 2012; Yin et al., 2003). Deshalb sollten die beiden EBNA1-Proteine, Wildtyp-EBNA1 und die EBNA1ΔGA-Deletionsmutante, dazu verwendet werden, die Antigenpräsentation unter den Aspekten einer verminderten Proteinsynthese und eines blockierten proteasomalen Abbaus zu untersuchen. In transfizierten Zellen wurde EBNA1ΔGA auf Proteinebene deutlich höher exprimiert als Wildtyp-EBNA1, was den beschriebenen, inhibitorischen Effekt auf die Translation zu bestätigen scheint. Unerwarteterweise wurden aber sowohl EBNA1- als auch EBNA1ΔGA-transfizierte Zellen ähnlich effizient von den EBNA1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt. Experimente mit einem Proteasom-Inhibitor verdeutlichten, dass die Generierung des EBNA1-Epitops Proteasom-abhängig erfolgte. Die Inhibition des proteasomalen Abbaus durch den GAR wirkte sich somit nicht auf die Antigengenerierung aus. Möglicherweise stammten die präsentierten Peptide von DRiPs, deren Abbau nicht durch den GAR inhibiert werden konnte. Da in den eigenen Versuchen auch kein Beitrag von maturem EBNA1ΔGA zum Antigenpool nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage nach der immunologischen Bedeutung des GAR, die bislang in der Verhinderung des proteasomalen Abbaus und dadurch in der Inhibition der Präsentation auf MHC-Klasse-I gesehen wurde. Die erhobenen Daten dagegen legen eher einen indirekten Effekt auf die Antigenpräsentation nahe: Indem der GAR matures EBNA1 vor dem proteasomalen Abbau schützt und dem Protein dadurch eine lange Lebensdauer verleiht, wird der Bedarf an Proteinnachschub gering gehalten. Dies sollte in einer geringen Neusyntheserate resultieren und damit in einer verminderten Antigengenerierung, wodurch infizierte Zellen womöglich einer Immunerkennung entgehen.

6.2 Einfluss der Antigen-kodierenden mRNA auf die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation

Generierung von Antigen während der ersten Runde der mRNA-Translation

In einer Reihe von Untersuchungen, einschließlich den eigenen, wurde ein enger Zusammenhang zwischen Antigentranslation und -präsentation beobachtet (Dolan et al., 2010a; Dolan et al., 2010b; Qian et al., 2006b). Eine neuere Studie ergab zudem, dass die Antigengenerierung während der ersten Runde der Translation erfolgt, noch vor einer möglichen Aktivierung des mRNA-Qualitätskontroll-Mechanismus NMD und dem dadurch ausgelösten Abbau der mRNA (Apcher et al., 2011). Dabei wurde postuliert, dass möglicherweise EJC nicht nur für die Aktivierung des NMD verantwortlich sind, sondern auch der Markierung untranslatierter mRNA dienen. Demnach würden EJC eine Unterscheidung zwischen neuen und bereits translatierten mRNA-Molekülen ermöglichen und damit die Steuerung der Antigengenerierung in der ersten Translationsrunde vermitteln (Apcher et al., 2011). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein ähnlicher experimenteller Ansatz verfolgt. Wie die Ergebnisse in Abbildung 5.10 zeigten, erfolgte die Antigengenerierung und -präsentation der Modellantigene BZLF1 und BZLF1+PTC mit vergleichbarer Effizienz und unabhängig von der mRNA-Menge. Da die PTC-tragende BZLF1-mRNA vermutlich den NMD-Mechanismus induzierte, resultierte dies im Abbau der entsprechenden mRNA und somit in einer wesentlich niedrigeren mRNA-Menge. Dieser Rückgang führte jedoch nicht zu Einbußen in der Antigenpräsentation, was ebenfalls für eine Antigensynthese während der ersten Runde der Translation sprach.

In einem zusätzlichen Vergleich von Zellen, die mit Plasmiden transfiziert worden waren, die entweder die cDNA oder die genomische Sequenz von BZLF1 trugen, wurden jedoch keine Unterschiede in der Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen detektiert. Dies deutete darauf hin, dass Antigene mit ähnlicher Effizienz aus gespleißter und ungespleißter mRNA generiert werden und stellte die Bedeutung von EJC für die Antigengenerierung in Frage.

Der Beitrag nukleärer Faktoren zur Antigengenerierung

Da mRNAs neben EJs auch mit anderen nukleären Faktoren assoziiert sein können (Cole und Scarcelli, 2006; Cullen, 2003; Kohler und Hurt, 2007), wurde eine mögliche Relevanz dieser Faktoren für die Generierung von Antigenen untersucht. Dazu wurden Zielzellen entweder mit DNA oder in ivtRNA transfiziert, die jeweils für das gleiche Modellantigen kodierten. Die transfizierten Zielzellen wurden in beiden Fällen von den Modellantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt. Da die ivtRNA durch den Herstellungsprozess frei von Proteinen war, scheinen mRNA assoziierte, nukleäre Faktoren nicht für die Antigengenerierung notwendig zu sein. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der ivtRNA im Rahmen der Transfektion in den Zellkern gelangte und dort nukleäre Faktoren band, die die anschließende Antigengenerierung im Zytoplasma steuerten. Auch bleibt unbeantwortet, ob die Antigengenerierung in beiden Fällen mit ähnlicher Effizienz erfolgte. Zwar wurden die Zellen sechs Stunden nach Transfektion mit ähnlicher Effizienz von den antigenspezifischen T-Zellen erkannt, doch wurden die Transfektanten zu diesem Zeitpunkt nicht fixiert. Dadurch kam es während der Kokultur mit den T-Zellen zu einer fortwährenden Transkription und Translation des Antigens in den Plasmid-transfizierten Zellen. In den ivtRNA-transfizierten Zellen dagegen kam es zu einer rapiden Abnahme der RNA-Menge über die Zeit, was vermutlich mit einer abnehmenden Neusynthese des Antigens einherging. Aussagen zur Effizienz der Antigengenerierung können deshalb nicht getroffen werden. Dennoch sprechen die ähnlichen RNA-Mengen zum Zeitpunkt der T-Zellzugabe und die daraus resultierende, ähnlich effiziente T-Zellerkennung gegen eine essentielle Rolle von nukleären Faktoren in der Antigengenerierung. Sollte sich diese Annahme in weiteren Untersuchungen bestätigen, so müssten neue Mechanismen oder Modifikationen für die Detektion untranslatierter mRNAs postuliert werden, um das Modell der Antigengenerierung in der ersten Translationsrunde zu stützen.

Bislang basierte dieses Modell auf Untersuchungen mit Modellantigenen, in denen durch die Einführung eines PTC und den dadurch vermutlich ausgelösten NMD die mRNA-Stabilität moduliert worden war. Eine Unabhängigkeit der Antigenpräsentation von der mRNA-Stabilität und damit einer Antigengenerierung während der wiederholten Translation einer mRNA konnte in diesen Untersuchungen jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Womöglich verbesserte die Trunkierung des Antigens durch die Einführung des PTC dessen Prozessierung und überdeckte so mögliche Effekte der mRNA-Stabilität auf die

Antigenpräsentation. Deshalb wurde in nachfolgenden Experimenten der Einfluss der mRNA-Stabilität mit Hilfe von mRNA-Varianten untersucht, die den gleichen offenen Leserahmen enthielten.

Durch Verwendung der 3'UTR der IFN γ -mRNA konnte die Stabilität der BZLF1-mRNA deutlich verringert werden. Dies resultierte zwar in einem niedrigen mRNA-Spiegel und in einer reduzierten Proteinexpression, hatte aber keinen mindernden Einfluss auf die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation. Diese Experimente lieferten somit einen weiteren Hinweis darauf, dass die mRNA-Halbwertszeit keinen Einfluss auf die Effizienz der Antigengenerierung hat.

Angesichts dieser Unabhängigkeit der Antigengenerierung von der mRNA-Stabilität sowie den fehlenden Hinweisen auf eine Markierung von neuen mRNAs für die Detektion der ersten Translationsrunde, wurde nach alternativen Erklärungsmodellen gesucht. Die bislang erhaltenen Ergebnisse standen auch in Einklang mit einem Modell, demnach neue mRNAs noch im Zellkern oder unmittelbar nach Austritt aus dem Zellkern ihre erste Translation erfahren, und diese Genprodukte in den Antigenpräsentationsweg eingeschleust werden. Um Hinweise auf eine mögliche, lokal begrenzte Antigengenerierung zu erhalten, wurden ergänzende Versuche durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dazu wurde die 3'UTR von β -Aktin an BZLF1 angefügt. An diese 3'UTR bindet das nukleäre Protein ZBP1 und verhindert die Translation der mRNA. ZBP1 wird in der Zellperipherie phosphoryliert, wodurch es von der mRNA dissoziiert und die Translation erlaubt (Farina et al., 2003; Katz et al., 2012; Kislauskis et al., 1997; Stohr und Huttelmaier, 2012). Das Anfügen der β -Aktin-3'UTR an die BZLF1-mRNA hatte jedoch keinen Einfluss auf die T-Zellerkennung. Da jedoch nicht überprüft werden konnte, ob das Anfügen der 3'UTR tatsächlich zu einer Translation in der Zellperipherie führte, war dieses negative Ergebnis nicht aussagekräftig. Auch die Untersuchung einer möglicherweise bereits im Zellkern stattfindenden Antigengenerierung, wie von Yewdell und Kollegen (David et al., 2012; Dolan et al., 2011a) postuliert, lieferte keine schlüssigen Ergebnisse. Da im Zellkern alle nötigen Komponenten der mRNA-Translation vorliegen, wäre es durchaus denkbar, dass Antigene nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Zellkern synthetisiert und direkt ins ER transportiert werden (Dahlberg und Lund, 2012; Dolan et al., 2010b; Gunasekera et al., 2004; Iborra et al., 2001; Iborra et al., 2004).

Zwar führte, wie erwartet, die Koexpression des viralen TAP-Inhibitors BNLF2a (Horst et al., 2009; Parcej und Tampe, 2010) zusammen mit BZLF1 zu einem signifikanten Einbruch der

BZLF1-Präsentation. Jedoch war die BZLF1-Präsentation in einem ähnlichen Ausmaß inhibiert, wenn eine durch das Anfügen von zwei GFP-Molekülen zytoplasmatisch lokalisierte BNLF2a-Variante (BNLF2a-GFP-GFP) oder eine durch zusätzliches Anfügen eines nukleären Lokalisationssignals (NLS) in den Zellkern dirigierte Variante (BNLF2a-GFP-GFP-NLS) koexprimiert wurden (Daten nicht gezeigt). Das Anfügen von zwei Molekülen GFP resultierte in einer Größe des Fusionsproteins, die eine passive Diffusion in bzw. aus dem Zellkern unterbinden sollte. Diese Beobachtungen sprachen für einen Transport von Peptiden durch TAP aus dem Zellkern und aus dem Zytoplasma direkt ins ER. In diesen Experimenten wurde zwar die korrekte, subzelluläre Lokalisation der BNLF2a-Fusionsproteine fluoreszenzmikroskopisch bestätigt, allerdings muss in zukünftigen Experimenten ausgeschlossen werden, dass die Überexpression dieser TAP-Inhibitoren nicht auch zu einer Inhibition von TAP im jeweils anderen Kompartiment führte.

Aufgrund der direkten Korrelation zwischen Antigentranslation und -präsentation stellte sich zudem die Frage, ob die Mechanismen der Translationsinitiation mit der Antigensynthese in Zusammenhang stehen. Die Initiation der Translation kann in eukaryotischen Zellen CAP-abhängig (Kong und Lasko, 2012) oder CAP-unabhängig an sogenannten IRES-Sequenzen erfolgen (Komar und Hatzoglou, 2011). Indem diese Sequenzbereiche eine spezielle Faltung einnehmen, ermöglichen sie ein CAP-unabhängiges Binden der Ribosomen und somit die Initiation der Translation (Jang et al., 1990). Die zwei Konstrukte BZLF1-IRES-GFP und GFP-IRES-BZLF1 ermöglichten die Messung und den Vergleich der BZLF1-Antigenpräsentation nach CAP-abhängiger und IRES-vermittelter, CAP-unabhängiger Translationsinitiation. Wie in zahlreichen Publikationen beschrieben, erfolgt bei bicistronischen mRNAs die CAP-vermittelte Proteinsynthese des ersten offenen Leserahmens weitaus effizienter als die des zweiten, welcher IRES-vermittelt translatiert wird (Mardanov et al., 2008; Mizuguchi et al., 2000). Jedoch konnte keine Korrelation zwischen den verschiedenen Formen der Translationsinitiation und Antigengenerierung detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnten Apcher und Kollegen zeigen, dass unterschiedliche Translationsinitiations-Mechanismen existieren, die entweder zur Produktion von Vollängenproteinen oder von antigenen Substraten führen (Apcher et al., 2011). Im Gegensatz zur Translation von Vollängenproteinen war die Generierung von Antigen zwar ebenfalls abhängig vom eukaryotischen Initiationsfaktor 4G, aber unabhängig von eIF4E, was die Autoren auf

unterschiedliche Translationsinitiations-Mechanismen schließen ließ (Apcher et al., 2011). Ob es sich dabei um einen neuen, der Antigengenerierung dienenden Initiationsmechanismus oder einen CAP-unabhängigen, durch ein bislang nicht identifiziertes IRES-Element in der mRNA des artifiziellen Modellantigens verursachten Initiationsmechanismus handelte, blieb ungeklärt.

Zusammenfassend bestätigten diese Ergebnisse, dass die Generierung von MHC-Klasse-I-Antigenen translationsabhängig, aber unabhängig von der subzellulären Lokalisation oder spezifischen, bekannten Mechanismen der Translationsinitiation erfolgt und vermutlich während der ersten Runde der Translation stattfindet. Da allerdings keine Evidenzen für eine Markierung neu transkribierter mRNAs erhalten wurden, stellt sich die Frage, über welche Mechanismen die erste Runde der Translation markiert bzw. detektiert wird. Statt EJC oder anderer nukleärer Faktoren wäre auch eine Markierung der mRNA durch das translatierende Ribosom als „bereits abgelesen“ denkbar. Als alternatives Modell wäre auch eine Antigentranslation an spezialisierten Ribosomen möglich. Voraussetzung hierfür wäre allerdings, dass die bekannten Mechanismen zur Regulation der mRNA-Stabilität, einschließlich NMD und 3'UTR, dort außer Kraft gesetzt sind. So könnten kurzlebige mRNAs oder mRNAs mit PTC für mehrere Translationsrunden als Matrize dienen. Eine weitere Voraussetzung hierfür wäre, dass nur ein kleiner Prozentsatz der mRNA eines Gens an diesen Ribosomen translatiert wird, damit er bei der Messung der Halbwertszeit der mRNA nicht ins Gewicht fällt. Berechnungen zur benötigten Menge an Translationsprodukt für die Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I ergaben, dass bereits weniger als 1 % aller neu synthetisieren Polypeptide ausreichen würden, um alle MHC-Klasse-I-Moleküle zu beladen (Princiotta et al., 2003). Derartige spezialisierte Ribosomen, die für die Synthese von Antigen verantwortlich sind und oft als „Immunoribosomen“ in der Literatur diskutiert werden (Yewdell, 2007), konnten bislang jedoch nicht identifiziert werden.

6.3 Die Rolle der Ubiquitynylierung in der MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung

Effiziente Antigenpräsentation trotz Mutation ubiquitynylierbarer Aminosäuren im Antigen

Da der proteasomale Proteinabbau eine zentrale Komponente im Antigenpräsentationsweg auf MHC-Klasse-I darstellt, liegt die Vermutung nahe, dass auch die mit dem proteasomalen Abbau in Zusammenhang stehende K48-verknüpfte Poly-Ubiquitynylierung zur Antigengenerierung beiträgt. Zudem gibt es direkte Hinweise für ein Mitwirken des Ubiquitinsystems im Antigenpräsentationsweg auf MHC-Klasse-I. So erfolgt beispielsweise die Internalisierung von MHC-Klasse-I-Molekülen von der Zelloberfläche auf Ubiquitin-abhängige Weise (Boname et al., 2010; Duncan et al., 2010; Goto et al., 2010).

Um die Rolle und die Bedeutung der Ubiquitynylierung in der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I zu untersuchen, wurden das virale Protein BZLF1 wie auch das zelluläre Protein MART-1 als Modellantigene verwendet. Beide Antigene wurden Proteasom-abhängig auf MHC-Klasse-I präsentiert, was eine Untersuchung der Rolle von Ubiquitin in der Antigenprozessierung gestattete.

Da eine Kopplung mit Ubiquitin nicht nur an K, sondern auch an C, S und T erfolgen kann (Shimizu et al., 2010), sollte untersucht werden, ob im Kontext der Antigenprozessierung eine Ubiquitynylierung bestimmter Aminosäuren essentiell ist. Zu diesem Zweck wurden verschiedene BZLF1-Mutanten hergestellt, die keine C, K, S oder T mehr besaßen. Bei keiner der Mutanten war jedoch die Antigenpräsentation vermindert, was auf eine mögliche Redundanz in der Verwendung dieser Aminosäuren als Ubiquitinakzeptoren hindeutete.

Die Antigenpräsentation setzt keine Ubiquitynylierung des Antigens voraus

Um zum einen eine mögliche Redundanz in der Verwendung von C, K, S und T als Ubiquitynylierungsstellen zu untersuchen, und zum andern Hinweise auf eine erforderliche Mindestanzahl an ubiquitynylierbarer Zielstrukturen zu erhalten, wurden sukzessive alle CKST-Aminosäuren gegen R oder A ausgetauscht. In der jeweiligen Vollmutante von BZLF1

und MART-1 waren keinerlei ubiquitinylierbare Aminosäuren innerhalb des Proteins mehr vorhanden. Die Abnahme der Anzahl der CKST-Aminosäuren in den Modellantigenen hatte erneut keine Auswirkung auf die Effizienz der Antigenpräsentation. Dadurch konnte sowohl eine Redundanz in der Verwendung ubiquitinylierbarer Aminosäuren, als auch eine notwendige Mindestanzahl an ubiquitinylierbaren Aminosäuren für die Antigengenerierung ausgeschlossen werden. Da auch bei Verwendung der jeweiligen BZLF1- und MART-1-Vollmutanten eine mit dem Wildtyp vergleichbare Antigenpräsentation detektiert wurde, erfolgte die Antigenprozessierung entweder Ubiquitin-unabhängig oder die Ubiquitinylierung erfolgte nicht direkt am Substrat. Auch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass eine Ubiquitinylierung am N-Terminus erfolgte und diese den proteasomalen Abbau vermittelte.

Um diese Möglichkeiten zu untersuchen, wurden im Fall von BZLF1 sowohl das Wildtyp-Protein, als auch die Vollmutante mittels massenspektrometrischer Analyse auf mögliche Ubiquitin-Konjugationen hin untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass das Wildtyp-Protein an verschiedenen Stellen ubiquitinyliert war, wohingegen die BZLF1-Vollmutante keine Ubiquitin-Seitenketten aufwies. Interessanterweise wurde in keinem der Proteine eine Ubiquitinylierung am N-Terminus detektiert, was darauf hinweist, dass im Falle der BZLF1-Vollmutante eine effiziente Generierung und Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen erfolgte, ohne dass eine Ubiquitinylierung vorlag.

Diese Erkenntnisse standen im scheinbaren Widerspruch zur bislang vorherrschenden Meinung, dass Antigene für die MHC-Klasse-I-Präsentation durch das Ubiquitin-Proteasom-System generiert werden (Goldberg et al., 2002; Rock und Goldberg, 1999; Townsend et al., 1988), sind aber in Einklang mit älteren Untersuchungen, die an einer Zelllinie mit einer temperatursensitiven Mutante des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1 erhoben wurden (Cox et al., 1995). Nach Inaktivierung des Enzyms bei erhöhter Temperatur war die Antigenpräsentation verstärkt. Die Antigengenerierung erfolgte folglich Ubiquitin-unabhängig (Dolan et al., 2011a; Dolan et al., 2011b; Qian et al., 2006a; Qian et al., 2006b). Allerdings wurde in dieser Veröffentlichung nicht überprüft, ob die E1-Enzymaktivität bei der verwendeten Temperatur komplett inhibiert war oder noch Restaktivität aufwies, und ob die untersuchten Antigene Proteasom-abhängig prozessiert wurden.

Die Ubiquitinylierung ist notwendig für die Antigenpräsentation, erfolgt jedoch nicht am Antigen selbst

Ein direkter Zusammenhang zwischen Ubiquitinylierung und Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I wurde durch Versuche nahegelegt, in denen zusätzlich zum Antigen auch eine Ubiquitin-Mutante mittels Transduktion in die Zielzellen eingebracht wurde, in der alle sieben K zu R mutiert waren (Ebstein et al., 2012; Huang et al., 2011). Dadurch sollte die Ausbildung von Poly-Ubiquitinketten gehemmt werden. Die Expression dieser Mutante führte in der Tat zu einem signifikanten Rückgang der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I. Jedoch konnte keine direkte Beteiligung der Poly-Ubiquitinketten an der Antigenprozessierung nachgewiesen werden. Da durch Ubiquitinylierung diverse zelluläre Prozesse gesteuert werden, blieb ungeklärt, welche für die Antigengenerierung relevanten Prozesse durch die Ubiquitinylierung gesteuert wurden. Denkbar wäre zum Beispiel, dass der Transport oder die Internalisierung von MHC-Klasse-I-Molekülen betroffen war (Boname et al., 2010; Goto et al., 2010). Aus diesem Grund wurde ein ähnlicher Versuchsansatz mit der Mutante Ub-K48R durchgeführt, welche keine K48-verknüpfte Poly-Ubiquitinylierung mehr gestatten und somit die proteasomale Degradation verhindern sollte. Die Koexpression der Ub-K33R-Mutante führte im Vergleich zu Wildtyp-Ubiquitin und der Ub-K33R-Mutante zu einem deutlichen Rückgang der T-Zellerkennung. Da die Präsentation eines Minigen-kodierten T-Zell-Epitops nicht durch Ub-K48R beeinträchtigt wurde, inhibierte die Ub-K48R-Mutante die Antigenpräsentation, nicht aber spätere Prozesse, wie beispielsweise den Antigentransport. Dass die Präsentation der BZLF1-Vollmutante ebenfalls durch Ub-K48R inhibiert wurde, schloss eine direkte Ubiquitinylierung des Antigens aus. Diese Ergebnisse könnten durch die Ubiquitinylierung eines Adaptermoleküls erklärt werden, welches die neu synthetisierten Antigene bindet. Demnach würde das Adaptermolekül eine Plattform für die K48-verknüpfte Poly-Ubiquitinylierung bieten und das Antigen direkt nach seiner Synthese zum Proteasom befördern. Dieses Modell würde darüber hinaus eine mögliche Erklärung dafür bieten, wie beispielsweise sehr kleine Proteine, die eventuell keine ubiquitinylierbaren Aminosäuren enthalten, ebenfalls effizient zur Antigengenerierung genutzt werden können. Da es in den Arbeiten von Schwab und Kollegen sowie Starck und Kollegen nach der Translationsinitiation an alternativen Start-Codons zur Synthese von kürzeren kryptischen Proteinen gekommen war und diese ebenfalls effizient für die MHC-Klasse-I-Präsentation

verwendet wurden (Schwab et al., 2003; Starck et al., 2008), besteht die Möglichkeit, dass manche dieser kryptischen Proteine aufgrund ihrer geringen Größe keine ubiquitinylierbaren Aminosäuren mehr besitzen. Allerdings wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht, ob die Präsentation dieser Proteine Proteasom-abhängig erfolgt war, oder ob die geringe Größe keinen proteasomalen Proteinabbau mehr erforderlich machte.

Auch würde das Modell eines Adaptermoleküls eine Erklärung für die Präsentation unterschiedlicher Antigene von vielen verschiedenen Pathogenen bieten. Die Ubiquitinylierung von Proteinen erfolgt durch E3-Ligasen, von denen im Menschen etwa 600 verschiedene existieren (Deshaies und Joazeiro, 2009; Husnjak und Dikic, 2012). Viele davon sind spezifisch für ein bestimmtes Substrat, beispielsweise wird p53 durch MDM2 ubiquitinyliert (Hu et al., 2012). Diese 600 E3-Ligasen können vermutlich nicht das gesamte Proteom aller Pathogene spezifisch abdecken. Da aber Antigene verschiedener Pathogene erfolgreich auf MHC-Klasse-I präsentiert werden, wäre zu fordern, dass entweder E3-Ligasen mit degeneriertem Substraterkennungsmotiv existieren, wie etwa für HRD1 und ERAD-Substrate gezeigt. Oder die Ubiquitinylierung erfolgt an Adaptermolekülen. Dadurch wäre die Spezifität der E3-Ubiquitin-Ligase(n) auf ein Protein oder eine Proteingruppe beschränkt. Im letzteren Fall stellt sich aber erneut die Frage, wie diese hypothetischen Adapterproteine viele verschiedene Proteine binden können. Einen Hinweis hierauf könnten möglicherweise die Versuche mit EBNA1 liefern. Matures EBNA1 ist extrem stabil und konnte auch durch die Fusion mit DD nicht destabilisiert werden. Eigene FACS-Analysen farbstoffmarkierter, konditional EBNA1-GFP exprimierender Transfektanten ergaben, dass nach Abschaltung der Expression die Menge an EBNA1-GFP in den Zellen nur durch die Zellteilung abnimmt (Daten nicht gezeigt). Vermutlich verhindert der GAR den proteasomalen Abbau von EBNA1 sehr effizient. Dennoch werden Peptide von EBNA1 translationsassoziiert generiert und auf MHC-Klasse-I präsentiert. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Antigengenerierung erfolgt, bevor das neu synthetisierte Protein, respektive der GAR, seine native Faltblattstruktur angenommen hat, die mit dem Schutz vor proteasomalem Abbau in Zusammenhang steht (Levitskaya et al., 1997). Dies wiederum könnte bedeuten, dass die Adapterproteine neu synthetisierte Proteine binden, welche die native Konformation noch nicht erreicht haben. Die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine wird durch *Chaperone*, wie beispielsweise Hitzeschockproteine, unterstützt. Es wäre möglich, dass solche *Chaperone* die Funktion von Adapterproteinen übernehmen. So könnte ein bestimmter Teil dieser Proteine

ubiquitinyliert, und das gebundene Substrat dem Proteasom zur Antigengenerierung zugeführt werden. Denkbar wäre auch, dass die *chaperone* das Protein dem proteasomalen Abbau zuführen, falls die Faltung misslingt, wie in der DRiP-Hypothese postuliert (Yewdell, 2011; Yewdell et al., 1996). Um zukünftig diese Möglichkeiten zu überprüfen, sind Untersuchungen mit chemischen Inhibitoren sowie *knock-down*-Experimente entsprechender Kandidatenproteine geplant.

Die Prozessierung von Antigen im ER erfolgt HRD1 unabhängig

Entgegen den eigenen Beobachtungen, dass die Antigenprozessierung keine direkte Ubiquitinylierung des Substrat-Proteins erfordert, wurde von Huang und Kollegen eine direkte Korrelation zwischen HRD1-vermittelter Ubiquitinylierung und der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation postuliert (Huang et al., 2011). Die siRNA-vermittelte Inhibition der HRD1-Expression führte in deren Experimenten zu einer signifikanten Reduktion der Antigenpräsentation von ERAD-Substraten (Huang et al., 2011). Diese Proteine werden durch die E3-Ubiquitin-Ligase HRD1 ubiquitinyliert, anschließend durch das Proteasom abgebaut und auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert (Wiertz et al., 1996; Kikkert et al., 2004). In der eigenen Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob Proteine, welche im ER lokalisiert sind, eventuell anderen Gesetzen der Antigenprozessierung unterliegen als zytoplasmatisch oder im Zellkern lokalisierte, was den Widerspruch der eigenen und der fremden Daten erklären könnte.

Dazu wurden die Modellantigene Wildtyp-BZLF1 bzw. BZLF1- Δ CKST durch Fusion mit der ER-Signalsequenz von ApoB ins ER dirigiert. Um den Einfluss von HRD1 zu testen, wurden die Proteine zusammen mit der E3-Ubiquitin-Ligase HRD1 oder der dominant-negativen Form dnHRD1 (Nadav et al., 2003) koexprimiert. Während die Proteinmenge von ApoB-BZLF1 nach Koexpression von dnHRD1 signifikant anstieg, war das Expressionsniveau der ApoB-BZLF1- Δ CKST Mutante unverändert. Dies wies auf einen durch HRD1-vermittelten Abbau von ApoB-BZLF1 hin, der im Fall der Vollmutante aufgrund fehlender ubiquitinylierbarer Aminosäuren nicht stattfand und deshalb das Expressionsniveau nicht beeinflusste.

Die Antigenpräsentation beider BZLF1-Proteine wurde jedoch weder durch HRD1 noch dnHRD1 beeinträchtigt. Die HRD1-vermittelte Ubiquitinylierung scheint somit allein die konventionelle Proteindegradation zu regulieren, nicht aber die Generierung von Antigen.

Diese Erkenntnisse wiesen auf eine ähnliche Antigenprozessierung hin, gleichwohl in welchem subzellulären Kompartiment die Substrat-Proteine exprimiert werden. In diesem Zusammenhang blieb ungeklärt, ob die Antigenprozessierung erst nach Rückkehr der Proteine aus dem ER ins Zytoplasma erfolgte oder ob Antigen durch Translation im Zytoplasma, z. B. an „Immunoribosomen“, generiert und direkt in den Präsentationsweg eingeschleust wurde.

Für das tumorassoziierte Antigen Tyrosinase war beschrieben worden, dass CD8⁺ T-Zellen aus einem Melanompatienten ein modifiziertes Epitop auf Tumorzellen erkennen, das statt Asparagin (N) die Aminosäure Asparaginsäure (D) enthält (Skipper et al., 1996). Diese Umwandlung basiert wahrscheinlich auf einer Desaminierung, wie sie bei der enzymatischen Spaltung einer N-Glykosylbindung auftritt (Altrich-VanLith et al., 2006; Ostankovitch et al., 2009). Da N-glykosidische Bindungen im ER ausgebildet werden, erfolgte die Antigengenerierung vermutlich erst nach Translation ins ER und Retranslokation aus dem ER ins Zytoplasma. Somit scheint ein Präsentationsweg zu existieren, der nicht unmittelbar mit der Antigentranslation assoziiert ist. Ob diese, durch die Retranslokation entfalteten Proteine, ebenfalls von einem hypothetischen Adaptorprotein gebunden werden und so in den gleichen Präsentationsweg gelangen wie zytoplasmatische/nukleäre Antigene oder ob alternative Präsentationswege für Proteine im ER existieren, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

7. Ausblick

Aus den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen zur Antigenquelle und zu den Mechanismen, welche die Generierung dieser Antigene steuern, ergeben sich weitere Fragen, deren Beantwortung zu einem umfassenderen Verständnis des Antigenpräsentationswegs auf MHC-Klasse-I beitragen kann.

Obwohl keine Hinweise auf einen Beitrag maturer Proteine zum Antigenpool erhalten wurden, blieb die Detektion von Peptiden auf MHC-Klasse-I-Molekülen mit sekundären Modifikationen mechanistisch ungeklärt. Ob mature Proteine in einem geringen, in den eigenen Versuchen nicht detektierten Ausmaß in den Antigenpräsentationsweg gelangen oder ob unterschiedliche Antigene unterschiedliche Präsentationswege benutzen, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Die enge Korrelation von Translation und Antigengenerierung, womöglich bereits während der ersten Translationsrunde, warf die Frage auf, wie die Translationsmaschinerie noch untranslatierte mRNAs detektiert. Auch ist bislang ungeklärt, ob generell alle oder nur bestimmte Genprodukte der ersten Translationsrunde abgebaut werden, und wie sie in den Antigenpräsentationsweg gelangen.

Der Nachweis einer wichtigen, aber indirekten Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Antigenprozessierung impliziert die Existenz eines oder mehrerer Adapterproteine, die neu synthetisierte Proteine binden und sie Ubiquitin-abhängig dem Proteasom zuführen. Von der molekularen Identifikation dieser postulierten Brückenproteine wird erwartet, dass sie zur Klärung von Identität und Regulation der Ubiquitin-übertragenden E3-Ligase beiträgt und letztlich die Beantwortung der Frage ermöglicht, ob alle Antigene für die Präsentation auf MHC-Klasse-I Ubiquitin-abhängig oder manche auch Ubiquitin-unabhängig generiert werden.

8. Literaturverzeichnis

- Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R.I., Lord, G.M., 2007. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 148, 32-46.
- Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K., Ichihara, A., 1994. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem* 115, 257-269.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Albiger, B., Dahlberg, S., Henriques-Normark, B., Normark, S., 2007. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* 261, 511-528.
- Altrich-VanLith, M.L., Ostankovitch, M., Polefrone, J.M., Mosse, C.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Engelhard, V.H., 2006. Processing of a class I-restricted epitope from tyrosinase requires peptide N-glycanase and the cooperative action of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 and cytosolic proteases. *J Immunol* 177, 5440-5450.
- Amerik, A.Y., Hochstrasser, M., 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695, 189-207.
- Anton, L.C., Villasevil, E.M., 2008. Is there an alternative to the proteasome in cytosolic protein degradation? *Biochem Soc Trans* 36, 839-842.
- Apcher, S., Daskalogianni, C., Lejeune, F., Manoury, B., Imhoos, G., Heslop, L., Fahraeus, R., 2011. Major source of antigenic peptides for the MHC class I pathway is produced during the pioneer round of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11572-11577.
- Apcher, S., Daskalogianni, C., Manoury, B., Fahraeus, R., 2010. Epstein Barr virus-encoded EBNA1 interference with MHC class I antigen presentation reveals a close correlation between mRNA translation initiation and antigen presentation. *PLoS Pathog* 6, e1001151.
- Apcher, S., Komarova, A., Daskalogianni, C., Yin, Y., Malbert-Colas, L., Fahraeus, R., 2009. mRNA translation regulation by the Gly-Ala repeat of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *J Virol* 83, 1289-1298.

- Apcher, S., Manoury, B., Fahraeus, R., 2012. The role of mRNA translation in direct MHC class I antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 24, 71-76.
- Attaya, M., Jameson, S., Martinez, C.K., Hermel, E., Aldrich, C., Forman, J., Lindahl, K.F., Bevan, M.J., Monaco, J.J., 1992. Ham-2 corrects the class I antigen-processing defect in RMA-S cells. *Nature* 355, 647-649.
- Awasthi, A., Kuchroo, V.K., 2009. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol* 21, 489-498.
- Banaszynski, L.A., Chen, L.C., Maynard-Smith, L.A., Ooi, A.G., Wandless, T.J., 2006. A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell* 126, 995-1004.
- Banaszynski, L.A., Sellmyer, M.A., Contag, C.H., Wandless, T.J., Thorne, S.H., 2008. Chemical control of protein stability and function in living mice. *Nat Med* 14, 1123-1127.
- Baum, C., Forster, P., Hegewisch-Becker, S., Harbers, K., 1994. An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques* 17, 1058-1062.
- Belsham, G.J., Sonenberg, N., 1996. RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiol Rev* 60, 499-511.
- Bergink, S., Jentsch, S., 2009. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* 458, 461-467.
- Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453, 1051-1057.
- Bianchi, K., Meier, P., 2009. A tangled web of ubiquitin chains: breaking news in TNF-R1 signaling. *Mol Cell* 36, 736-742.
- Boname, J.M., Thomas, M., Stagg, H.R., Xu, P., Peng, J., Lehner, P.J., 2010. Efficient internalization of MHC I requires lysine-11 and lysine-63 mixed linkage polyubiquitin chains. *Traffic* 11, 210-220.
- Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.M., Laux, G., Bachl, J., Korndorfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., Chapman, R.D., Nimmerjahn, F., Mautner, J., Hillen, W., Bujard, H., Feuillard, J., 2005. Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33, e137.
- Brosh, R., Rotter, V., 2009. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 9, 701-713.

- Burdek, M., Spranger, S., Wilde, S., Frankenberger, B., Schendel, D.J., Geiger, C., 2010. Three-day dendritic cells for vaccine development: antigen uptake, processing and presentation. *J Transl Med* 8, 90.
- Busch, R., Doebele, R.C., Patil, N.S., Pashine, A., Mellins, E.D., 2000. Accessory molecules for MHC class II peptide loading. *Curr Opin Immunol* 12, 99-106.
- Cadwell, K., Coscoy, L., 2005. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* 309, 127-130.
- Cardinaud, S., Starck, S.R., Chandra, P., Shastri, N., 2010. The synthesis of truncated polypeptides for immune surveillance and viral evasion. *PLoS One* 5, e8692.
- Carroll, M.C., Prodeus, A.P., 1998. Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 10, 36-40.
- Chung, C.T., Niemela, S.L., Miller, R.H., 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2172-2175.
- Ciechanover, A., Ben-Saadon, R., 2004. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol* 14, 103-106.
- Claessen, J.H., Kundrat, L., Ploegh, H.L., 2012. Protein quality control in the ER: balancing the ubiquitin checkbook. *Trends Cell Biol* 22, 22-32.
- Cole, C.N., Scarcelli, J.J., 2006. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 18, 299-306.
- Conti, E., Izaurralde, E., 2005. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol* 17, 316-325.
- Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A.L., 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65, 801-847.
- Cox, J.H., Galardy, P., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 1995. Presentation of endogenous and exogenous antigens is not affected by inactivation of E1 ubiquitin-activating enzyme in temperature-sensitive cell lines. *J Immunol* 154, 511-519.
- Cresswell, P., 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84, 505-507.
- Cullen, B.R., 2003. Nuclear RNA export. *J Cell Sci* 116, 587-597.
- Dahlberg, J., Lund, E., 2012. Nuclear translation or nuclear peptidyl transferase? *Nucleus* 3, 320-321.

- Dantuma, N.P., Sharipo, A., Masucci, M.G., 2002. Avoiding proteasomal processing: the case of EBNA1. *Curr Top Microbiol Immunol* 269, 23-36.
- Daskalogianni, C., Apcher, S., Candeias, M.M., Naski, N., Calvo, F., Fahraeus, R., 2008. Gly-Ala repeats induce position- and substrate-specific regulation of 26 S proteasome-dependent partial processing. *J Biol Chem* 283, 30090-30100.
- David, A., Dolan, B.P., Hickman, H.D., Knowlton, J.J., Clavarino, G., Pierre, P., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2012. Nuclear translation visualized by ribosome-bound nascent chain puromycylation. *J Cell Biol* 197, 45-57.
- Del Prete, G., 1998. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol* 16, 427-455.
- den Haan, J.M., Lehar, S.M., Bevan, M.J., 2000. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192, 1685-1696.
- Deshaies, R.J., Joazeiro, C.A., 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78, 399-434.
- Dolan, B.P., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2011a. Translating DRiPs: progress in understanding viral and cellular sources of MHC class I peptide ligands. *Cell Mol Life Sci* 68, 1481-1489.
- Dolan, B.P., Knowlton, J.J., David, A., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2010a. RNA polymerase II inhibitors dissociate antigenic peptide generation from normal viral protein synthesis: a role for nuclear translation in defective ribosomal product synthesis? *J Immunol* 185, 6728-6733.
- Dolan, B.P., Li, L., Takeda, K., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2010b. Defective ribosomal products are the major source of antigenic peptides endogenously generated from influenza A virus neuraminidase. *J Immunol* 184, 1419-1424.
- Dolan, B.P., Li, L., Veltri, C.A., Ireland, C.M., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2011b. Distinct pathways generate peptides from defective ribosomal products for CD8+ T cell immunosurveillance. *J Immunol* 186, 2065-2072.
- Dolan, B.P., Sharma, A.A., Gibbs, J.S., Cunningham, T.J., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2012. MHC class I antigen processing distinguishes endogenous antigens based on their translation from cellular vs. viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 7025-7030.
- Driscoll, J., Brown, M.G., Finley, D., Monaco, J.J., 1993. MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* 365, 262-264.
- Duncan, L.M., Nathan, J.A., Lehner, P.J., 2010. Stabilization of an E3 ligase-E2-ubiquitin complex increases cell surface MHC class I expression. *J Immunol* 184, 6978-6985.

- Dustin, M.L., Long, E.O., 2010. Cytotoxic immunological synapses. *Immunol Rev* 235, 24-34.
- Ebstein, F., Lehmann, A., Kloetzel, P.M., 2012. The FAT10- and ubiquitin-dependent degradation machineries exhibit common and distinct requirements for MHC class I antigen presentation. *Cell Mol Life Sci* 69, 2443-2454.
- Engelhard, V.H., Altrich-Vanlith, M., Ostankovitch, M., Zarling, A.L., 2006. Post-translational modifications of naturally processed MHC-binding epitopes. *Curr Opin Immunol* 18, 92-97.
- Farfan-Arribas, D.J., Stern, L.J., Rock, K.L., 2012. Using intein catalysis to probe the origin of major histocompatibility complex class I-presented peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16998-17003.
- Farina, K.L., Huttelmaier, S., Musunuru, K., Darnell, R., Singer, R.H., 2003. Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *J Cell Biol* 160, 77-87.
- Finley, D., 2009. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* 78, 477-513.
- Gaczynska, M., Rock, K.L., Goldberg, A.L., 1993. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 365, 264-267.
- Galkin, O., Bentley, A.A., Gupta, S., Compton, B.A., Mazumder, B., Kinzy, T.G., Merrick, W.C., Hatzoglou, M., Pestova, T.V., Hellen, C.U., Komar, A.A., 2007. Roles of the negatively charged N-terminal extension of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein S5 revealed by characterization of a yeast strain containing human ribosomal protein S5. *RNA* 13, 2116-2128.
- Gershoni, J.M., Palade, G.E., 1982. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal Biochem* 124, 396-405.
- Gilbert, W.V., 2010. Alternative ways to think about cellular internal ribosome entry. *J Biol Chem* 285, 29033-29038.
- Gingras, A.C., Raught, B., Sonenberg, N., 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68, 913-963.
- Glickman, M.H., Ciechanover, A., 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.

- Goldberg, A.L., Cascio, P., Saric, T., Rock, K.L., 2002. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 39, 147-164.
- Goto, E., Yamanaka, Y., Ishikawa, A., Aoki-Kawasumi, M., Mito-Yoshida, M., Ohmura-Hoshino, M., Matsuki, Y., Kajikawa, M., Hirano, H., Ishido, S., 2010. Contribution of lysine 11-linked ubiquitination to MIR2-mediated major histocompatibility complex class I internalization. *J Biol Chem* 285, 35311-35319.
- Groettrup, M., Kirk, C.J., Basler, M., 2010. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol* 10, 73-78.
- Grogan, J.L., Locksley, R.M., 2002. T helper cell differentiation: on again, off again. *Curr Opin Immunol* 14, 366-372.
- Guillaume, B., Stroobant, V., Bousquet-Dubouch, M.P., Colau, D., Chapiro, J., Parmentier, N., Dalet, A., Van den Eynde, B.J., 2012. Analysis of the processing of seven human tumor antigens by intermediate proteasomes. *J Immunol* 189, 3538-3547.
- Gunasekera, N., Lee, S.W., Kim, S., Musier-Forsyth, K., Arriaga, E., 2004. Nuclear localization of aminoacyl-tRNA synthetases using single-cell capillary electrophoresis laser-induced fluorescence analysis. *Anal Chem* 76, 4741-4746.
- Hammer, G.E., Gonzalez, F., Champsaur, M., Cado, D., Shastri, N., 2006. The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat Immunol* 7, 103-112.
- Hansen, T.H., Bouvier, M., 2009. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nat Rev Immunol* 9, 503-513.
- Heath, W.R., Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Forehan, S.P., Parish, I.A., Davey, G.M., Wilson, N.S., Carbone, F.R., Villadangos, J.A., 2004. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199, 9-26.
- Heath, W.R., Carbone, F.R., 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1, 126-134.
- Heemels, M.T., Ploegh, H., 1995. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 64, 463-491.
- Herberts, C., Reits, E., Neefjes, J., 2003. Proteases, proteases and proteases for presentation. *Nat Immunol* 4, 306-308.
- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.

- Hirsch, C., Gauss, R., Horn, S.C., Neuber, O., Sommer, T., 2009. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* 458, 453-460.
- Horst, D., van Leeuwen, D., Croft, N.P., Garstka, M.A., Hislop, A.D., Kremmer, E., Rickinson, A.B., Wiertz, E.J., Rensing, M.E., 2009. Specific targeting of the EBV lytic phase protein BNLF2a to the transporter associated with antigen processing results in impairment of HLA class I-restricted antigen presentation. *J Immunol* 182, 2313-2324.
- Hu, W., Feng, Z., Levine, A.J., 2012. The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2. *Genes Cancer* 3, 199-208.
- Huang, H., Jeon, M.S., Liao, L., Yang, C., Elly, C., Yates, J.R., 3rd, Liu, Y.C., 2010. K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity* 33, 60-70.
- Huang, L., Marvin, J.M., Tatsis, N., Eisenlohr, L.C., 2011. Cutting Edge: Selective role of ubiquitin in MHC class I antigen presentation. *J Immunol* 186, 1904-1908.
- Husnjak, K., Dikic, I., 2012. Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem* 81, 291-322.
- Iborra, F.J., Jackson, D.A., Cook, P.R., 2001. Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* 293, 1139-1142.
- Iborra, F.J., Jackson, D.A., Cook, P.R., 2004. The case for nuclear translation. *J Cell Sci* 117, 5713-5720.
- Ikeda, F., Dikic, I., 2008. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep* 9, 536-542.
- Ishihara, T., Kudo, A., Watanabe, T., 1984. Induction of immunoglobulin gene expression in mouse fibroblasts by cycloheximide treatment. *J Exp Med* 160, 1937-1942.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U., Pestova, T.V., 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 113-127.
- Jang, S.K., Pestova, T.V., Hellen, C.U., Witherell, G.W., Wimmer, E., 1990. Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme* 44, 292-309.
- Katz, Z.B., Wells, A.L., Park, H.Y., Wu, B., Shenoy, S.M., Singer, R.H., 2012. beta-Actin mRNA compartmentalization enhances focal adhesion stability and directs cell migration. *Genes Dev* 26, 1885-1890.

- Kawai, T., Akira, S., 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637-650.
- Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., Lieberman, J., 2005. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* 23, 249-262.
- Khan, S., de Giuli, R., Schmidtke, G., Bruns, M., Buchmeier, M., van den Broek, M., Groettrup, M., 2001. Cutting edge: neosynthesis is required for the presentation of a T cell epitope from a long-lived viral protein. *J Immunol* 167, 4801-4804.
- Kikkert, M., Doolman, R., Dai, M., Avner, R., Hassink, G., van Voorden, S., Thanedar, S., Roitelman, J., Chau, V., Wiertz, E., 2004. Human HRD1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279, 3525-3534.
- Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., Harper, J.W., Gygi, S.P., 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell* 44, 325-340.
- Kislauskis, E.H., Zhu, X., Singer, R.H., 1997. beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility. *J Cell Biol* 136, 1263-1270.
- Kloetzel, P.M., 2004. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 5, 661-669.
- Kohler, A., Hurt, E., 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 761-773.
- Komander, D., Clague, M.J., Urbe, S., 2009. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 550-563.
- Komar, A.A., Hatzoglou, M., 2011. Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* 10, 229-240.
- Kong, J., Lasko, P., 2012. Translational control in cellular and developmental processes. *Nat Rev Genet* 13, 383-394.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388, 621-625.
- Kwun, H.J., da Silva, S.R., Qin, H., Ferris, R.L., Tan, R., Chang, Y., Moore, P.S., 2011. The central repeat domain 1 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) latency associated-nuclear antigen 1 (LANA1) prevents cis MHC class I peptide presentation. *Virology* 412, 357-365.

- Kwun, H.J., da Silva, S.R., Shah, I.M., Blake, N., Moore, P.S., Chang, Y., 2007. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mimics Epstein-Barr virus EBNA1 immune evasion through central repeat domain effects on protein processing. *J Virol* 81, 8225-8235.
- Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L., Pickart, C.M., 2002. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416, 763-767.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., Moore, M.J., 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J* 20, 4987-4997.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E., Moore, M.J., 2000a. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J* 19, 6860-6869.
- Le Hir, H., Moore, M.J., Maquat, L.E., 2000b. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev* 14, 1098-1108.
- Lee, S.P., Brooks, J.M., Al-Jarrah, H., Thomas, W.A., Haigh, T.A., Taylor, G.S., Humme, S., Schepers, A., Hammerschmidt, W., Yates, J.L., Rickinson, A.B., Blake, N.W., 2004. CD8 T cell recognition of endogenously expressed Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *J Exp Med* 199, 1409-1420.
- Lejeune, F., Ranganathan, A.C., Maquat, L.E., 2004. eIF4G is required for the pioneer round of translation in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 11, 992-1000.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G., Masucci, M.G., 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375, 685-688.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., Masucci, M.G., 1997. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12616-12621.
- Liaskou, E., Wilson, D.V., Oo, Y.H., 2012. Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators Inflamm* 2012, 949157.
- Lu, X., Gibbs, J.S., Hickman, H.D., David, A., Dolan, B.P., Jin, Y., Kranz, D.M., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., Varma, R., 2012. Endogenous viral antigen processing generates peptide-specific MHC class I cell-surface clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 15407-15412.

- Mackay, L.K., Long, H.M., Brooks, J.M., Taylor, G.S., Leung, C.S., Chen, A., Wang, F., Rickinson, A.B., 2009. T cell detection of a B-cell tropic virus infection: newly-synthesised versus mature viral proteins as antigen sources for CD4 and CD8 epitope display. *PLoS Pathog* 5, e1000699.
- Mallette, F.A., Richard, S., 2012. K48-linked ubiquitination and protein degradation regulate 53BP1 recruitment at DNA damage sites. *Cell Res* 22, 1221-1223.
- Malnati, M.S., Marti, M., LaVaute, T., Jaraquemada, D., Biddison, W., DeMars, R., Long, E.O., 1992. Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* 357, 702-704.
- Malys, N., McCarthy, J.E., 2011. Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. *Cell Mol Life Sci* 68, 991-1003.
- Maquat, L.E., 1995. When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA* 1, 453-465.
- Maquat, L.E., 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 89-99.
- Mardanov, E.S., Zamchuk, L.A., Ravin, N.V., 2008. Contribution of internal initiation to translation of cellular mRNAs containing IRESs. *Biochem Soc Trans* 36, 694-697.
- Maroteaux, L., Chen, L., Mitrani-Rosenbaum, S., Howley, P.M., Revel, M., 1983. Cycloheximide induces expression of the human interferon beta 1 gene in mouse cells transformed by bovine papillomavirus-interferon beta 1 recombinants. *J Virol* 47, 89-95.
- Marx, C., Held, J.M., Gibson, B.W., Benz, C.C., 2010. ErbB2 trafficking and degradation associated with K48 and K63 polyubiquitination. *Cancer Res* 70, 3709-3717.
- Mavropoulos, A., Sully, G., Cope, A.P., Clark, A.R., 2005. Stabilization of IFN-gamma mRNA by MAPK p38 in IL-12- and IL-18-stimulated human NK cells. *Blood* 105, 282-288.
- Medzhitov, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Miossec, P., Korn, T., Kuchroo, V.K., 2009. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 361, 888-898.
- Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Hayakawa, T., 2000. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther* 1, 376-382.

- Mo, X.Y., Cascio, P., Lemerise, K., Goldberg, A.L., Rock, K., 1999. Distinct proteolytic processes generate the C and N termini of MHC class I-binding peptides. *J Immunol* 163, 5851-5859.
- Mukherjee, P., Dani, A., Bhatia, S., Singh, N., Rudensky, A.Y., George, A., Bal, V., Mayor, S., Rath, S., 2001. Efficient presentation of both cytosolic and endogenous transmembrane protein antigens on MHC class II is dependent on cytoplasmic proteolysis. *J Immunol* 167, 2632-2641.
- Murphy, K.M., Stockinger, B., 2010. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol* 11, 674-680.
- Nadav, E., Shmueli, A., Barr, H., Gonen, H., Ciechanover, A., Reiss, Y., 2003. A novel mammalian endoplasmic reticulum ubiquitin ligase homologous to the yeast Hrd1. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 91-97.
- Nagarajan, N.A., Gonzalez, F., Shastri, N., 2012. Nonclassical MHC class Ib-restricted cytotoxic T cells monitor antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol* 13, 579-586.
- Nagy, E., Buhlmann, J.E., Henics, T., Waugh, M., Rigby, W.F., 1994. Selective modulation of IFN-gamma mRNA stability by IL-12/NKSF. *Cell Immunol* 159, 140-151.
- Nagy, E., Maquat, L.E., 1998. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 23, 198-199.
- Nicholson, P., Muhlemann, O., 2010. Cutting the nonsense: the degradation of PTC-containing mRNAs. *Biochem Soc Trans* 38, 1615-1620.
- Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E.M., Pardoll, D.M., Bornkamm, G.W., Mautner, J., 2003. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* 33, 1250-1259.
- Ostankovitch, M., Altrich-Vanlith, M., Robila, V., Engelhard, V.H., 2009. N-glycosylation enhances presentation of a MHC class I-restricted epitope from tyrosinase. *J Immunol* 182, 4830-4835.
- Pain, V.M., 1996. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 236, 747-771.
- Pamer, E., Cresswell, P., 1998. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16, 323-358.
- Parcej, D., Tampe, R., 2010. ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition. *Nat Chem Biol* 6, 572-580.

- Piccirillo, C.A., d'Hennezel, E., Sgouroudis, E., Yurchenko, E., 2008. CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the control of autoimmunity: in vivo veritas. *Curr Opin Immunol* 20, 655-662.
- Pickart, C.M., 1997. Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J* 11, 1055-1066.
- Princiotta, M.F., Finzi, D., Qian, S.B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgereit, F., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2003. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18, 343-354.
- Prlic, M., Williams, M.A., Bevan, M.J., 2007. Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Curr Opin Immunol* 19, 315-319.
- Qian, S.B., Princiotta, M.F., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2006a. Characterization of rapidly degraded polypeptides in mammalian cells reveals a novel layer of nascent protein quality control. *J Biol Chem* 281, 392-400.
- Qian, S.B., Reits, E., Neefjes, J., Deslich, J.M., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2006b. Tight linkage between translation and MHC class I peptide ligand generation implies specialized antigen processing for defective ribosomal products. *J Immunol* 177, 227-233.
- Rammensee, H.G., Falk, K., Rotzschke, O., 1993. MHC molecules as peptide receptors. *Curr Opin Immunol* 5, 35-44.
- Reits, E.A., Vos, J.C., Gromme, M., Neefjes, J., 2000. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404, 774-778.
- Reyes-Turcu, F.E., Wilkinson, K.D., 2009. Polyubiquitin binding and disassembly by deubiquitinating enzymes. *Chem Rev* 109, 1495-1508.
- Rock, K.L., Farfan-Arribas, D.J., Shen, L., 2010. Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation. *J Immunol* 184, 9-15.
- Rock, K.L., Goldberg, A.L., 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17, 739-779.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L., 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.
- Rubenstein, E.M., Kreft, S.G., Greenblatt, W., Swanson, R., Hochstrasser, M., 2012. Aberrant substrate engagement of the ER translocon triggers degradation by the Hrd1 ubiquitin ligase. *J Cell Biol* 197, 761-773.

- Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., Wilson, I.A., 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24, 419-466.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-787.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Saric, T., Chang, S.C., Hattori, A., York, I.A., Markant, S., Rock, K.L., Tsujimoto, M., Goldberg, A.L., 2002. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* 3, 1169-1176.
- Savina, A., Amigorena, S., 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 219, 143-156.
- Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., Bennink, J.R., 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.
- Schwab, S.R., Li, K.C., Kang, C., Shastri, N., 2003. Constitutive display of cryptic translation products by MHC class I molecules. *Science* 301, 1367-1371.
- Seifert, U., Maranon, C., Shmueli, A., Desoutter, J.F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P., Diescher, S., Andrieu, M., de la Salle, H., Weinschenk, T., Schild, H., Laderach, D., Galy, A., Haas, G., Kloetzel, P.M., Reiss, Y., Hosmalin, A., 2003. An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat Immunol* 4, 375-379.
- Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., Shastri, N., 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480-483.
- Shastri, N., Cardinaud, S., Schwab, S.R., Serwold, T., Kunisawa, J., 2005. All the peptides that fit: the beginning, the middle, and the end of the MHC class I antigen-processing pathway. *Immunol Rev* 207, 31-41.
- Shimizu, Y., Okuda-Shimizu, Y., Hendershot, L.M., 2010. Ubiquitylation of an ERAD substrate occurs on multiple types of amino acids. *Mol Cell* 40, 917-926.
- Sijts, E.J., Kloetzel, P.M., 2011. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell Mol Life Sci* 68, 1491-1502.
- Skipper, J.C., Hendrickson, R.C., Gulden, P.H., Brichard, V., Van Pel, A., Chen, Y., Shabanowitz, J., Wolfel, T., Slingluff, C.L., Jr., Boon, T., Hunt, D.F., Engelhard, V.H., 1996. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational

- modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* 183, 527-534.
- Sloan, V.S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., Zaller, D.M., 1995. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 375, 802-806.
- Snyder, J.T., Alexander-Miller, M.A., Berzofsky, J.A., Belyakov, I.M., 2003. Molecular mechanisms and biological significance of CTL avidity. *Curr HIV Res* 1, 287-294.
- Sonenberg, N., Hinnebusch, A.G., 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.
- Starck, S.R., Ow, Y., Jiang, V., Tokuyama, M., Rivera, M., Qi, X., Roberts, R.W., Shastri, N., 2008. A distinct translation initiation mechanism generates cryptic peptides for immune surveillance. *PLoS One* 3, e3460.
- Stohr, N., Huttelmaier, S., 2012. IGF2BP1: a post-transcriptional "driver" of tumor cell migration. *Cell Adh Migr* 6, 312-318.
- Strehl, B., Seifert, U., Kruger, E., Heink, S., Kuckelkorn, U., Kloetzel, P.M., 2005. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* 207, 19-30.
- Tanaka, K., 1994. Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing. *J Leukoc Biol* 56, 571-575.
- Tellam, J., Fogg, M.H., Rist, M., Connolly, G., Tschärke, D., Webb, N., Heslop, L., Wang, F., Khanna, R., 2007. Influence of translation efficiency of homologous viral proteins on the endogenous presentation of CD8+ T cell epitopes. *J Exp Med* 204, 525-532.
- Tellam, J.T., Lekieffre, L., Zhong, J., Lynn, D.J., Khanna, R., 2012. Messenger RNA sequence rather than protein sequence determines the level of self-synthesis and antigen presentation of the EBV-encoded antigen, EBNA1. *PLoS Pathog* 8, e1003112.
- Toes, R.E., Nussbaum, A.K., Degermann, S., Schirle, M., Emmerich, N.P., Kraft, M., Laplace, C., Zwinderman, A., Dick, T.P., Müller, J., Schonfisch, B., Schmid, C., Fehling, H.J., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., Schild, H., 2001. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* 194, 1-12.
- Townsend, A., Bastin, J., Gould, K., Brownlee, G., Andrew, M., Coupar, B., Boyle, D., Chan, S., Smith, G., 1988. Defective presentation to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vaccinia-infected cells is overcome by enhanced degradation of antigen. *J Exp Med* 168, 1211-1224.

- Townsend, A., Ohlen, C., Bastin, J., Ljunggren, H.G., Foster, L., Karre, K., 1989. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 340, 443-448.
- Tsang, M.L., Munz, C., 2011. Cytolytic T lymphocytes from HLA-B8+ donors frequently recognize the Hodgkin's lymphoma associated latent membrane protein 2 of Epstein Barr virus. *Herpesviridae* 2, 4.
- Vembar, S.S., Brodsky, J.L., 2008. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 944-957.
- Vermeij, R., Leffers, N., van der Burg, S.H., Melief, C.J., Daemen, T., Nijman, H.W., 2011. Immunological and clinical effects of vaccines targeting p53-overexpressing malignancies. *J Biomed Biotechnol* 2011, 702146.
- Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W., 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68, 1015-1068.
- Vogt, A.B., Kropshofer, H., 1999. HLA-DM - an endosomal and lysosomal chaperone for the immune system. *Trends Biochem Sci* 24, 150-154.
- Wagner, S.A., Beli, P., Weinert, B.T., Nielsen, M.L., Cox, J., Mann, M., Choudhary, C., 2011. A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol Cell Proteomics* 10, M111.013284.
- Wang, J., Zhao, Q., Qi, Q., Gu, H.Y., Rong, J.J., Mu, R., Zou, M.J., Tao, L., You, Q.D., Guo, Q.L., 2011. Gambogic acid-induced degradation of mutant p53 is mediated by proteasome and related to CHIP. *J Cell Biochem* 112, 509-519.
- Wang, X., Herr, R.A., Chua, W.J., Lybarger, L., Wiertz, E.J., Hansen, T.H., 2007. Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *J Cell Biol* 177, 613-624.
- Wolf, B.J., Princiotta, M.F., 2011. Viral and bacterial minigene products are presented by MHC class I molecules with similar efficiencies. *Mol Immunol* 48, 463-471.
- Xie, Y., 2010. Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome. *J Mol Cell Biol* 2, 308-317.
- Yewdell, J., 2002. To DRiP or not to DRiP: generating peptide ligands for MHC class I molecules from biosynthesized proteins. *Mol Immunol* 39, 139-146.
- Yewdell, J.W., 2007. Plumbing the sources of endogenous MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 19, 79-86.

- Yewdell, J.W., 2011. DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends Immunol* 32, 548-558.
- Yewdell, J.W., Anton, L.C., Bennink, J.R., 1996. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol* 157, 1823-1826.
- Yewdell, J.W., Nicchitta, C.V., 2006. The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends Immunol* 27, 368-373.
- Yewdell, J.W., Reits, E., Neefjes, J., 2003. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3, 952-961.
- Yin, Y., Manoury, B., Fahraeus, R., 2003. Self-inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein-Barr virus-encoded EBNA1. *Science* 301, 1371-1374.
- Yu, J., Russell, J.E., 2001. Structural and functional analysis of an mRNP complex that mediates the high stability of human beta-globin mRNA. *Mol Cell Biol* 21, 5879-5888.
- Zhang, P., Summer, W.R., Bagby, G.J., Nelson, S., 2000. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev* 173, 39-51.
- Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C., 1979. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol* 27, 51-177.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Fiebiger BM, Moosmann A, Behrends U and Mautner J (2012). Mature proteins derived from Epstein-Barr virus fail to feed into the MHC class I antigenic pool. *Eur J Immunol* 42 (12): 3167-73.

Folgende Teile dieser Arbeit befinden sich in Vorbereitung für die Veröffentlichung:

Fiebiger BM, Kaufmann R, Behrends U, Mautner J (2013). MHC I antigen processing does not require direct ubiquitination of antigenic substrate proteins. *Manuskript in Vorbereitung*

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt Herrn PD Dr. Josef Mautner für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Für die intensive Betreuung, das große Interesse und der Geduld, die er mir und dieser Arbeit entgegenbrachte. Seine kritische Beurteilung der Ergebnisse und sein Engagement haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Vielen Dank für die schöne und lehrreiche Zeit in Deinem Labor.

Bei Frau Prof. Dr. Uta Behrends möchte ich mich ebenfalls für die hervorragende Betreuung sowie für die Mithilfe der schriftlichen Ausarbeitung dieser Arbeit bedanken.

Für die Anfertigung des Zweitgutachtens möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß bedanken.

Außerdem gilt mein Dank meinen Laborkollegen, für die stets gute Arbeitsatmosphäre, die interessanten Gespräche und die gute Zusammenarbeit im Labor.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Simon, ohne deren ständige Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt gilt mein herzlichster Dank meiner Verlobten Ulrike, die mich während dieser Zeit stets ermutigt hat. Ihr Verständnis und ihre Unterstützung haben entscheidend dazu beigetragen diese Arbeit anzufertigen. Ich hoffe auf eine gemeinsame und erfolgreiche Zukunft mit Dir.

Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Benjamin-Maximillian Fiebiger

Geburtsdatum: 16. Februar 1982

Geburtsort: Göppingen

■ Bildungsweg

1988 – 1992 Grundschule Marktschule Ebersbach/Fils

1992 – 1995 Raichberg-Gymnasium Ebersbach/Fils

1995 – 1999 Raichberg-Realschule Ebersbach/Fils

1999 – 2002 Wirtschaftsgymnasium Göppingen
Abschluss: Abitur

2004 – 2006 Grundstudium der Biologie an der Universität Hohenheim

2006 – 2009 Hauptstudium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Abschluss Diplom in Biologie (Dipl. Biol. Univ.)
Note: 1,3
Titel der Diplomarbeit: *Etablierung eines reversiblen Verfahrens zur Modulation der Stabilität viraler Proteine in humanen B-Zellen*

Seit 2009 Promotion am Helmholtz Zentrum München im Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik
Titel der Arbeit: *Charakterisierung von Mechanismen der Antigenprozessierung für die Präsentation auf MHC-Klasse-I*